

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2002-531146

(P2002-531146A)

(43) 公表日 平成14年9月24日 (2002.9.24)

(51) Int.Cl.	識別記号	F I	テコード (参考)
C 1 2 N 15/09	ZNA	C 0 7 K 14/435	4 B 0 2 4
C 0 7 K 14/435		C 1 2 N 1/15	4 B 0 6 4
C 1 2 N 1/15		1/19	4 B 0 6 5
1/19		1/21	4 H 0 4 5
1/21		C 1 2 P 21/02	C

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 68 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2000-586958 (P2000-586958)
 (86) (22) 出願日 平成11年12月10日 (1999.12.10)
 (85) 翻訳文提出日 平成13年6月8日 (2001.6.8)
 (86) 国際出願番号 PCT/US99/29405
 (87) 国際公開番号 WO00/34526
 (87) 国際公開日 平成12年6月15日 (2000.6.15)
 (31) 優先権主張番号 09/210, 330
 (32) 優先日 平成10年12月11日 (1998.12.11)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (81) 指定国 EP (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), JP

(71) 出願人 クロンテック・ラボラトリーズ・インコーポレーテッド
 アメリカ合衆国カリフォルニア州94303,
 バロ・アルト, イースト・メドウ・ドライブ 1020
 (72) 発明者 ルキヤム, セルゲイ アナトリエビッチ
 ロシア国 モスクワ, ウーリツァ ゴルビンスカヤ 13/1-161
 (74) 代理人 弁理士 山本 秀策

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 Anthozoa 綱の非生物発光性種由来の蛍光タンパク質、そのようなタンパク質をコードする遺伝子、およびそれらの使用

(57) 【要約】

本発明は、Anthozoa 綱由来の非生物発光性種由来の新規な蛍光タンパク質 (具体的には、amFP486、cFP484、zFP506、zFP538、dsFP483、drFP583、asFP600、dgFP512、およびdmFP592 からなる群より選択される、単離および精製された蛍光タンパク質) に関する。その蛍光タンパク質をコードする核酸配列を同定する方法、さらにそのタンパク質を分析する方法が開示される。

(2)

特表2002-531146

【特許請求の範囲】

【請求項1】 天然の環境以外において存在する非生物発光性Anthozoa蛍光タンパク質。

【請求項2】 Anemonia majano、Clavularia sp.、Zoanthus sp.、Discosoma sp.「red」、Discosoma striata、Anemonia sulcata、Discosoma sp.「magenta」、およびDiscosoma sp.「green」からなる群より選択される非生物発光性Anthozoa種によって産生される、請求項1に記載のタンパク質。

【請求項3】 amFP486、cFP484、zFP506、zFP538、dsFP483、drFP583、asFP600、dgFP512、およびdmFP592からなる群より選択される、請求項2に記載のタンパク質。

【請求項4】 配列番号55；配列番号56；配列番号57；配列番号58；配列番号59；配列番号60；配列番号61；配列番号62；および配列番号63からなる群より選択される配列を有する、請求項2に記載のタンパク質。

【請求項5】 単離されている、請求項1～4のいずれか1項に記載のタンパク質。

【請求項6】 天然の環境以外において存在する核酸であって、ここで該核酸は請求項1～5のいずれか1項に記載のタンパク質、またはそのフラグメントをコードするヌクレオチド配列を有する、核酸。

【請求項7】 請求項6に記載の核酸のフラグメント。

【請求項8】 ベクターおよび請求項6または7に記載の核酸を含む、構築物。

【請求項9】 請求項6または7に記載の核酸で形質転換した細胞、またはその後代。

【請求項10】 請求項1～5のいずれか1項に記載のタンパク質を産生する方法であって、該方法は以下の工程：

該タンパク質を産生するために請求項9に記載の細胞を増殖させる工程、を包含する、方法。

(3)

特表2002-531146

【請求項 1 1】 蛍光タンパク質をコードする核酸を利用する適用であって、
ここで改善点として：
請求項 6 または 7 に記載の核酸を利用する工程、
を包含する、適用。

(4)

特表2002-531146

【発明の詳細な説明】

【0001】

(発明の背景)

本発明は、分子生物学の分野に関する。より具体的には、本発明は、新規な蛍光タンパク質、そのタンパク質をコードするDNA配列を同定する方法、およびそれらの使用に関する。

【0002】

(関連技術の説明)

蛍光標識は、目的のタンパク質、細胞、または生物を標識するための特に有用なツールである。伝統的に、目的のタンパク質は精製され、次いで蛍光団誘導体に共有結合的に結合体化される。インビボ研究のために、次いで、タンパク質-色素複合体が、マイクロベッティングまたは可逆的透過処理の方法を使用して、目的の細胞に挿入される。しかし、色素吸着工程および色素挿入工程は、プロセスを、骨が折れかつ制御することが困難にする。目的のタンパク質を標識する代替的な方法は、目的のタンパク質を発現する遺伝子を、マーカーを発現する遺伝子に連結または融合させ、次いで融合産物を発現することである。タンパク質標識のこの方法のための代表的なマーカーは、 β -ガラクトシダーゼ、ホタルルシフェラーゼおよび細菌ルシフェラーゼである。しかし、これらのマーカーは、外因性の基質または補因子を必要とし、従ってインビボ研究のためには用途が限定される。

【0003】

外因性補因子または基質を必要としないマーカーは、クラゲである *Aequorea victoria* のグリーン蛍光タンパク質 (GFP) であり、このタンパク質は、395 nm に最大励起を有し、475 nm に第2の励起ピークおよび510 nm に最大発光を有する。GFP は、238 アミノ酸タンパク質であり、アミノ酸65~67 が発色団の形成に関与する。

【0004】

遺伝子発現およびタンパク質局在の研究のための GFP の使用は、Chalfie ら、*Science* 263 (1994)、802-805 頁、および He

(5)

特表2002-531146

imら、Proc. Natl. Acad. Sci. 91 (1994)、12501-12504によって詳細に議論される。さらに、Rizzutoら、Curr. Biology 5 (1995)、635-642は、細胞中で細胞内オルガネラを可視化するためのツールとしての野生型GFPの使用を議論するが、一方KaetherおよびGerdes、Febs Letters 369 (1995)、267-271は、野生型GFPを使用して、分泌経路に沿ったタンパク質輸送の可視化を報告する。植物細胞におけるGFPの発現は、HuおよびCheng、Febs Letters 369 (1995)、331-334によって議論されるが、一方Drosophila胚におけるGFP発現は、Davisら、Dev. Biology 170 (1995)、726-729によって記載される。

【0005】

野生型GFPおよび変異型GFP S65Tの結晶構造は、GFPの三次元構造がバレルに類似することを示す(Ormoら、Science 273 (1996) 1392-1395; Yangら、Nature Biotechnol. 14 (1996)、1246-1251)。バレルは、コンパクトな構造中の β シートからなり、ここで、その中心において、発色団を含有する α ヘリックスは、バレルによって遮蔽されている。コンパクトな構造は、GFPを、多様な条件下および/または厳しい条件下(例えば、プロテアーゼ処理)で非常に安定にして、一般に、GFPを極度に有用なレポーターにする。しかし、GFPの安定性は、短期間の事象または反復する事象を決定することについて、GFPを最適より下にする。

【0006】

多数の研究が行われており、種々の研究目的のために、GFPの特性を改善し、そして、有用かつ最適化されたGFP試薬を生成する。GFPの新しいバージョンが開発され(例えば、「ヒト化」されたGFP DNA)、そのタンパク質産物が哺乳動物細胞中で合成を増大される(Haasら、Current Biology 6 (1996) 315-324; Yangら、Nucleic Acids Research 24 (1996) 4592-4593)。そのよ

(6)

特表2002-531146

うな1つのヒト化タンパク質は、「増強されたグリーン蛍光タンパク質 (EGFP)」である。GFPへの他の変異は、ブルー光、シアン光、およびイエローグリーン光放射バージョンを生じた。GFPの大きな有用性に関わらず、GFPに類似しているかまたは異なる特性を有する他の蛍光タンパク質が、当該分野において有用である。新規な蛍光タンパク質は、可能な新規な色を生じるか、またはpH依存性の蛍光を生成する。より大きな励起についての新規なスペクトルおよびより良好な適合性に基づいて、新規な蛍光タンパク質の他の有用な利点には、蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) の可能性を含む。

【0007】

先行技術は、そのDNAコード配列が公知である新規な蛍光タンパク質において不完全である。本発明は、当該分野におけるこの長年にわたる必要性を満足する。

【0008】

(発明の要旨)

本発明は、amFP486、cFP484、zFP506、zFP538、dsFP483、drFP583、asFP600、dgFP512、およびdmFP592からなる群より選択される、単離および精製された蛍光タンパク質に関する。

【0009】

本発明の1つの実施形態において、サンプル中の核酸配列の存在をスクリーニングする工程を包含する、蛍光タンパク質をコードするDNA配列を同定する方法が提供され、ここで上記核酸配列は、配列番号3、5、8、11、12、および14からなる群より選択される配列を有するペプチドをコードする。上記核酸配列の存在は、上記蛍光タンパク質をコードするDNA配列を同定する。

【0010】

本発明の別の実施形態において、サンプル中の核酸配列の存在をスクリーニングする工程を包含する、蛍光タンパク質をコードするDNA配列を同定する方法が提供され、ここで上記核酸配列は、配列番号4、6、7、9、10、13、15、および16からなる群より選択されるプライマーとハイブリダイズする。上

(7)

特表2002-531146

記核酸配列の存在は、蛍光タンパク質をコードするDNA配列を同定する。

【0011】

本発明のさらに別の実施形態において、細胞中で蛍光タンパク質を分析する方法が提供され、上記方法は、上記細胞中で配列番号55～63からなる群より選択されるアミノ酸配列を有する蛍光タンパク質をコードする核酸配列を発現する工程；および上記タンパク質からの蛍光シグナルを測定する工程を包含する。この方法はさらに、上記シグナルに従って上記細胞を分別する工程を包含する。好ましくは、上記細胞は、蛍光活性化細胞分別法によって分別される。なお好ましくは、上記核酸配列が、上記蛍光タンパク質に融合された目的のタンパク質をコードする目的の遺伝子を含み、ここで上記目的のタンパク質は上記蛍光タンパク質と異なる。検出された蛍光シグナルは、上記細胞中の上記目的の遺伝子の存在を、およびさらに、上記目的のタンパク質の存在を示す。上記蛍光タンパク質の細胞内局在を同定することによって、上記目的のタンパク質の細胞内局在もまた、同定される。

【0012】

本発明の他のおよびさらなる局面、特色、および利点は、開示の目的のために与えられる本発明の現在好ましい実施形態の以下の記載から明白である。

【0013】

(発明の詳細な説明)

本明細書において用いる場合、用語「GFP」は、*Aequorea victoria*由来の塩基性のグリーン蛍光タンパク質をいう。これには、より大きい蛍光を提供するかまたは異なる色で蛍光発光するように操作されたGFPの先行技術のバージョンを含む。*Aequorea victoria*のGFPの配列(配列番号54)は、Presherら、Gene 111(1992)、229～33に開示されている。

【0014】

本明細書において用いる場合、用語「EGFP」は、2つのアミノ酸置換を有するGFPの変異改変体をいう：F64LおよびS65T(Heimら、Nature 373(1995)、663～664)。用語「ヒト化」は、ヒト細胞

(8)

特表2002-531146

におけるタンパク質の発現についてコドン最適化するようにGFP核酸配列に作製された変化をいう (Yangら、Nucleic Acids Research 24 (1996)、4592~4593)。

【0015】

本発明に従って、従来の分子生物学、微生物学および組換えDNA技術 (当業者の範囲内) が使用され得る。このような技術は、文献中で十分に説明される。

例えば、Maniatis、FritschおよびSambrook、「Molecular Cloning: A Laboratory Manual (1982)」; 「DNA Cloning: A Practical Approach」第I巻およびII巻 (D. N. Glover編、1985); 「Oligonucleotide Synthesis」 (M. J. Gait編、1984); 「Nucleic Acid Hybridization」 (B. D. HamesおよびS. J. Higgins編 (1985)); 「Transcription and Translation」 (B. D. HamesおよびS. J. Higgins編 (1984)); 「Animal Cell Culture」 (R. I. Freshney編 (1986)); 「Immobilized Cells and Enzymes」 (IRL Press, (1986)); B. Perbal、「A Practical Guide To Molecular Cloning」 (1984) を参照のこと。

【0016】

「ベクター」は、プラスミド、ファージまたはコスミドのようなレプリコンである。ここでは、付着したセグメントの複製をもたらすように、別のDNAセグメントが付着され得る。

【0017】

「DNA分子」は、一本鎖形態または二本鎖ヘリックスのいずれかでの、デオキシリボヌクレオチド (アデニン、グアニン、チミンまたはシトシン) のポリマー形成をいう。この用語は、この分子の一次構造および二次構造のみをいい、そして任意の特定の3次形態に限定しない。従って、この用語は、とりわけ、直線状DNA分子 (例えば、制限フラグメント)、ウイルス、プラスミド、および染

(9)

特表2002-531146

色体に見出される二本鎖DNAを含む。

【0018】

DNA「コード配列」は、適切な調節配列の制御下に配置された場合、インピボで転写されポリペプチドに翻訳されるDNA配列である。コード配列の境界は、5'（アミノ）末端の開始コドンおよび3'（カルボキシ）末端の翻訳終止コドンにより決定される。コード配列としては以下が挙げられるがこれらに限定されない：原核生物配列、真核生物mRNA由来のcDNA、真核生物（例えば、哺乳動物）DNA由来ゲノムDNA配列、および合成DNA配列。ポリアデニル化シグナルおよび転写終止配列は、コード配列の3'側に位置付けされ得る。

【0019】

本明細書において用いる場合、用語「ハイブリダイゼーション」は、反対側の核酸鎖の残基の間の水素結合により安定化された逆平行の二重鎖を形成する2つの核酸鎖の会合のプロセスをいう。

【0020】

用語「オリゴヌクレオチド」は、短い（100塩基長未満）の核酸分子をいう。

【0021】

本明細書において用いる場合、「DNA調節配列」は、プロモーター、エンハンサー、ポリアデニル化シグナル、ターミネーターなどのような転写制御配列および翻訳制御配列である。これは、宿主細胞中のコード配列の発現を提供し、そして／または発現を調節する。

【0022】

「プロモーター配列」は、細胞中のRNAポリメラーゼに結合し得、そして下流（3'方向）コード配列の転写を開始し得るDNA調節領域である。本発明を規定する目的のために、このプロモーター配列を、転写開始部位によりその3'末端で結合し、上記の検出可能バックグラウンドレベルで転写を開始するのに必要な最小数の塩基またはエレメントを含むように上流（5'方向）に伸長する。プロモーター配列内に、転写開始部位、およびRNAポリメラーゼの結合の原因であるタンパク質結合ドメインが見出される。真核生物プロモーターは、しばし

(10)

特表2002-531146

ば(ただし常にではない)「TATA」ボックスおよび「CAT」ボックスを含む。種々のプロモーター(誘導プロモーターを含む)が、本発明の種々のベクターを駆動するために用いられ得る。

【0023】

本明細書において用いる場合、用語「制限エンドヌクレアーゼ」および「制限酵素」は、それぞれが特異的ヌクレオチド配列でまたはその近位で二本鎖DNAを切断する細菌酵素をいう。

【0024】

細胞は、外因性DNAまたは異種DNAが細胞の内側に導入された場合、このようなDNAにより「形質転換」または「トランスフェクト」されている。形質転換するDNAは、細胞のゲノムに組み込まれてもよいし、または組み込まれなくても(共有結合)よい。原核生物細胞、酵母細胞および哺乳動物細胞において、例えば、形質転換DNAは、プラスミドのようなエピソードのエLEMENT上に維持され得る。真核生物細胞に関しては、安定に形質転換された細胞は、形質転換DNAが染色体に組み込まれており、それにより形質転換DNAが染色体複製を通じて娘細胞に遺伝される細胞である。この安定性は、この真核生物細胞が形質転換DNAを含む娘細胞の集団からなる細胞株またはクローンを樹立する能力により実証される。「クローン」は、単一の細胞または有糸分裂による共通の祖先に由来する細胞の集団である。「細胞株」は、多くの世代についてインビトロで安定に増殖し得る初代細胞のクローンである。

【0025】

DNA構築物の「異種」領域は、事実上、より大きい分子との会合が見出されていない、より大きいDNA分子内の、同定可能なDNAセグメントである。従って、この異種領域が哺乳動物遺伝子をコードする場合、この遺伝子は、供給源の生物体のゲノム中の哺乳動物ゲノムDNAに隣接しないDNAと、通常隣接する。別の実施例では、異種DNAは、2つの異なる供給源由来の遺伝子の部分が(融合タンパク質産物を産生するように)一緒にされている構築物中にコード配列を含む。対立遺伝子改変体または天然に存在する変異事象は、本明細書において規定されるようなDNAの異種領域を生じない。

(11)

特表2002-531146

【0026】

本明細書において用いる場合、用語「レポーター遺伝子」は、異種プロモーターまたはエンハンサーエレメントに結合したコード配列（そしてその産物は、その構築物が組織または細胞中に導入される場合、容易にそして定量的にアッセイされ得る）をいう。

【0027】

本明細書において記載されるアミノ酸は、「L」異性体形態であることが好ましい。このアミノ酸配列は、1文字コードで与えられる（A：アラニン；C：システイン；D：アスパラギン酸；E：グルタミン酸；F：フェニルアラニン；G：グリシン；H：ヒスチジン；I：イソロイシン；K：リジン；L：ロイシン；M：メチオニン；N：アスパラギン；P：プロリン；Q：グルタミン；R：アルギニン；S：セリン；T：トレオニン；V：バリン；W：トリプトファン；Y：チロシン；X：任意の残基）。NH₂は、ポリペプチドのアミノ末端に存在する遊離のアミノ基をいう。COOHは、ポリペプチドのカルボキシ末端に存在する遊離のカルボキシ基をいう。標準的ポリペプチド命名法に従って、J. Biol. Chem. 243 (1969)、3552～59を用いる。

【0028】

本発明は、amFP486、cFP484、zFP506、zFP538、dsFP483、drFP583、asFP600、dgFP512およびdmFP592からなる群より選択される単離かつ精製された蛍光タンパク質に関する。

【0029】

本発明の1つの実施形態において、蛍光タンパク質をコードするDNA配列を同定する方法が提供される。この方法は、サンプル中の核酸配列の存在についてのスクリーニングの工程であって、ここで、この核酸配列は、配列番号3、5、8、11、12および14からなる群より選択される配列を有するペプチドをコードする工程、を包含する。核酸配列の存在は、蛍光タンパク質をコードするDNA配列を同定する。

【0030】

(12)

特表2002-531146

本発明の別の実施形態において、蛍光タンパク質をコードするDNA配列を同定する方法が提供される。この方法は、サンプル中の核酸配列の存在についてのスクリーニングの工程であって、ここで、この核酸配列は、配列番号4、6、7、9、10、13、15および16からなる群より選択されるプライマーにハイブリダイズする工程、を包含する。核酸配列の存在は、蛍光タンパク質をコードするDNA配列を同定する。

【0031】

本発明のなお別の実施形態において、細胞中の蛍光タンパク質を分析する方法が提供される。この方法は、細胞中の配列番号55～63からなる群より選択されるアミノ酸配列を有する蛍光タンパク質をコードする核酸配列を発現する工程；およびこのタンパク質由来の蛍光シグナルを測定する工程、を包含する。この方法は、さらにシグナルに従って細胞をソートする工程を包含する。好ましくは、この細胞は蛍光発色セルソーティング (fluorescence activated cell sorting: 蛍光標示式細胞ソーティング) によりソートされる。なお好ましくは、この核酸配列は、蛍光タンパク質に融合される (ここで目的のタンパク質は蛍光タンパク質とは別である)、目的のタンパク質をコードする目的の遺伝子を含む。検出された蛍光シグナルは、目的の遺伝子、およびさらに細胞中の目的のタンパク質の存在を示す。蛍光タンパク質の細胞内位置を同定することにより、目的のタンパク質の細胞内位置がまた同定される。

【0032】

以下の実施例は、本発明の種々の実施形態を例示する目的のために与えられ、そしていかなる様式でも本発明を限定することは意図されない。

【0033】

(実施例1)

(生物学的材料)

新規な蛍光タンパク質を、Anthozoaのいくつかの属から同定した。これらの属は、いかなる生物発光も示さないが、通常の白色光または紫外光の下で観察した場合に、蛍光色を有する。6つの種を選択した (表1を参照のこと)。

【0034】

(13)

特表2002-531146

【表 1】

(表 1)

(この研究において使用した *Anthozoa* の種)

種	起源の領域	蛍光色
<i>Anemonia majano</i>	西太平洋	明緑色の触手端(tentacle tip)
<i>Clavularia</i> sp.	西太平洋	明緑色の触手および口の円盤 (oral disk)
<i>Zoanthus</i> sp.	西太平洋	黄緑色の触手および口の円盤
<i>Discosoma</i> sp. 「赤」	西太平洋	口の円盤上の橙-赤の斑点 (spot oral disk)
<i>Discosoma striata</i>	西太平洋	口の円盤上の青-緑の縞
<i>Discosoma</i> sp. 「マゼンタ」	西太平洋	かすかに紫色の口の円盤
<i>Discosoma</i> sp. 「緑」	西太平洋	口の円盤上の緑の斑点
<i>Anemonia sulcata</i>	地中海	紫色の触手端

(実施例 2)

(cDNAの調製)

全RNAを、ChomczynskiおよびSacchi (Chomczynski P. ら、Anal. Biochem. 162 (1987)、156~159) のプロトコルに従って、目的の種から単離した。第1鎖cDNAを、SMART PCR cDNA合成キット (CLONTECH) を提供されたプロトコルに従って使用して、1~3 μ g の全RNAから開始して合成したが、唯一、このキット中に提供された「cDNA合成プライマー」をプライマーTN3 (5'-CGCAGTCGACCG (T)₁₃、配列番号1) (表2) で置き換える変更を行った。次いで、増幅されたcDNAサンプルを、提供されたプロトコルに記載されたように調製したが、ただし、PCRに使用した2つのプライマーがTSプライマー (5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT、配列

(14)

特表2002-531146

番号2) (表2) およびTN3プライマー (表2) であった (ともに、0.1 μ Mの濃度) ことが異なる。20~25回のPCRサイクルを実施して、cDNAサンプルを増幅した。この増幅されたcDNAを水で20倍希釈し、そしてこの希釈物のうちの1 μ lを、続く手順にて使用した。

【0035】

(表2)

cDNA合成およびRACEにて使用したオリゴ

【0036】

【表2】

TN3: 5'-CGCAGTCGACCG(T)₁₅
(配列番号 1)

T7-TN3: 5'-GTAATACGACTCACTATAGGGCCGACGTCGACCG(T)₁₅
(配列番号 17)

TS-プライマー: 5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT
(配列番号 2)

T7-TS:
5'-GTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT
(配列番号 18)

T7: 5'-GTAATACGACTCACTATAGGGC
(配列番号 19)

TS-オリゴ 5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACGCGrGrG
(配列番号 53)

(実施例3)

(オリゴの設計)

新規な蛍光タンパク質のcDNAのフラグメントを単離するために、縮重プライマーを使用するPCRを実施した。縮重プライマーは、蛍光タンパク質のファミリー中で最も変化しないと予測された領域におけるmRNAの配列と一致する

(15)

特表2002-531146

ように設計した。このような4つのストレッチを選択し(表3)、そして縮重プライマーの変異体を設計した。このようなプライマーはすべて、mRNAの3'末端に関連した。すべてのオリゴを、使用前にゲル精製した。表2は、cDNA合成およびRACEにおいて使用したオリゴを示す。

【0037】

(表3)

(重要なアミノ酸ストレッチおよび蛍光タンパク質の単離のために使用した対応縮重プライマー)

【0038】

【表3】

A. victoria GFP (7) によるストレッチの位置	重要なストレッチの アミノ酸配列	縮重プライマーの 名前 および 配列
20-25	GXVNGH (配列番号 3)	NGH: 5'- GA(C,T) GGC TGC GT(A,T,G,C) AA(T,C) GG(A,T,G) CA (配列番号 4)
31-35	GEGEG (配列番号 5) GEGNG (配列番号 8)	GEGa: 5'- GTT ACA GGT GA(A,G) GG(A,C) GA(A,G) GG (配列番号 6) GEGb: 5'- GTT ACA GGT GA(A,G) GG(T,G) GA(A,G) GG (配列番号 7) GNGa: 5'- GTT ACA GGT GA(A,G) GG(A,C) AA(C,T) GG (配列番号 9) GNGb: 5'- GTT ACA GGT GA(A,G) GG(T,G) AA(C,T) GG (配列番号 10)
127-131	GMNFP (配列番号 11) GVNFP (配列番号 12)	NFP: 5' TTC CA(C,T) GGT (G,A)TG AA(C,T) TT(C,T) CC (配列番号 13)
134-137	GPVM (配列番号 14)	PVMa: 5' CCT GCC (G,A)A(C,T) GGT CC(A,T,G,C) GT(A,C) ATG (配列番号 15) PVMb: 5' CCT GCC (G,A)A(C,T) GGT CC(A,T,G,C) GT(G,T) ATG (配列番号 16)

(実施例4)

(16)

特表2002-531146

(nFPの3' - cDNAフラグメントの単離)

3' - RACEの改変型ストラテジーを使用して、標的フラグメントを単離した(図1を参照のこと)。このRACEストラテジーは、連続する2つのPCR工程を含んだ。第1のPCR工程は、第1の縮重プライマー(表4)およびcDNA合成のために使用されたTN3プライマーと同一の3'部分を有する、T7-TN3プライマー(配列番号17)(T7-TN3の配列については、表2)を含んだ。このPCR工程において長い方であるT7-TN3プライマーを置き換えた理由は、短い方であるTN3プライマーを使用した場合、特にT7-TN3プライマーを低濃度(0.1 μ M)にて使用した場合に、生じるバックグラウンド増幅が効果的に抑制されたことである(Frohmanら(1998)PNAS USA、85、8998~9002)。第2のPCR工程は、TN3プライマー(配列番号1、表2)および第2の縮重プライマー(表4)を含んだ。

【0039】

(表4)

(nFP cDNAの3'フラグメントの特異的増幅を生じる、第1および第2のPCRのための縮重プライマーの組み合わせ)

【0040】

【表4】

(17)

特表2002-531146

種	第1の縮重 プライマー	第2の縮重プライマー
Anemonia majano	NGH (配列番号 4)	GNGb (配列番号 10)
Clavularia sp.	NGH (配列番号 4)	GEGa (配列番号 6)
Zoanthus sp.	NGH (配列番号 4)	GEGa (配列番号 6)
Discosoma sp. “赤”	NGH (配列番号 4)	GEGa (配列番号 6), NFP (配列番号 13) または PVMB (配列番号 16)
Discosoma striata	NGH (配列番号 4)	NFP (配列番号 13)
Anemonia sulcata	NGH (配列番号 4)	GEGa (配列番号 6) または NFP (配列番号 13)

第1のPCR反応を、以下のように実施した：増幅されたcDNAサンプルの20倍希釈物1 μ lを反応混合物に添加した。この反応混合物は、提供された緩衝液を含む1 \times Advantage KlenTaq Polymerase Mix (CLONTECH)、200 μ M dNTP、0.3 μ Mの第1の縮重プライマー（表4）および0.1 μ MのT7-TN3（配列番号17）プライマーを、総量20 μ lにて含んでいた。サイクルのプロフィールは、以下の（Hybaid OmniGene Thermocycler、チューブコントロールモード）であった：95℃で10秒、55℃で1分、72℃で40秒を1サイクル；95℃で10秒、62℃で30秒、72℃で40秒を24サイクル。次いで、この反応物を水で20倍希釈し、そしてこの希釈物のうちの1 μ lを第2のPCR反応物に添加した。この第2のPCR反応物は、製造業者により提供された緩衝液を含む1 \times Advantage KlenTaq Polymerase Mix (CLONTECH)、200 μ M dNTP、0.3 μ Mの第

(18)

特表2002-531146

2の縮重プライマー（表4）および0.1 μ MのTN3プライマーを含んでいた。サイクルのプロフィールは、以下の（Hybaid OmniGene Thermocycler、チューブコントロールモード）であった：95℃で10秒、55℃（GEG/GNGまたはPVMに関して）または52℃（NFPに関して）で1分、72℃で40秒を1サイクル；95℃で10秒、62℃（GEG/GNGまたはPVMに関して）または58℃（NFPに関して）で30秒、72℃で40秒を13サイクル。PCRの産物を、製造業者のプロトコルに従って、PCR-Scriptベクター（Stratagene）中にクローニングした。

【0041】

縮重プライマーの異なる組み合わせを、各種由来のDNAに対する第1および第2のPCR反応において試し続けて、特異的増幅を生じるプライマーの組み合わせを見出した。この特定の増幅とは、予期されるサイズの顕著なバンド（NGHおよびGEG/GNGについて約650～800bp、そしてNFPおよびPVMについて約350～500bp（時に、少数の弱いバンドを伴う））が、2つのPCR反応後にアガロースゲル上で検出されたことを意味する。Anthozoa綱の異なる種についてのプライマーの選り抜きの組み合わせを、表4に列挙する。プライマーの他のいくつかの組み合わせもまた、正確なサイズのフラグメントの増幅を生じたが、これらのフラグメントの配列は、同定された他の蛍光タンパク質またはAequorea victoria GFPに対して、相同性を示さなかった。

【0042】

（実施例5）

（全長cDNAのコピーの取得）

得られた新規な蛍光タンパク質cDNAの3'フラグメントを配列決定する際に、2つの5'指向性（directed）入れ子（nested）プライマーをcDNAについて合成し（表5）、次いでこのcDNAの5'末端を、連続する2つのPCRを使用して増幅した。その次のPCR反応において、「ステップアウトPCR」という新規なアプローチを使用して、バックグラウンドの増幅を

(19)

特表2002-531146

抑制した。このステップアウト反応混合物は、製造業者により提供された緩衝液を用いる1× Advantage KlenTaq Polymerase Mix (CLONTECH)、200 μ M dNTP、0.2 μ Mの第1の遺伝子特異的プライマー（表5を参照のこと）、0.02 μ MのT7-TSプライマー（配列番号18）、0.1 μ MのT7プライマー（配列番号19）および増幅されたcDNAサンプルの20倍希釈物1 μ lを、総容量20 μ lにて含んでいた。サイクルのプロフィールは、以下の（Hybaid OmniGene Thermocycler、チューブコントロールモード）であった：95℃で10秒、60℃で30秒、72℃で40秒を23～27サイクル。増幅の産物を水で50倍希釈し、そしてこの希釈物のうちの1 μ lを、第2の（入れ子）PCRに添加した。この反応は、提供された緩衝液を含む1× Advantage KlenTaq Polymerase Mix (CLONTECH)、200 μ M dNTP、0.2 μ Mの第2の遺伝子特異的プライマーおよび0.1 μ MのTSプライマー（配列番号2）を、総容量20 μ lにて含んでいた。サイクルのプロフィールは、以下の（Hybaid OmniGene Thermocycler、チューブコントロールモード）であった：95℃で10秒、60℃で30秒、72℃で40秒を12サイクル。次いで増幅の産物を、製造業者のプロトコルに従って、pAtlasベクター（CLONTECH）中にクローニングした。

【0043】

（表5）

（5' - RACEに使用した遺伝子特異的プライマー）

【0044】

【表5】

(20)

特表2002-531146

種	第1のプライマー	第2の(入子)プライマー
Anemonia majano	5'-GAAATAGTCAGGCATACTGGT (配列番号 20)	5'-GTCAGGCATAC TGGTAGGAT (配列番号 21)
Clavularia sp.	5'-CTTGAAATAGTCTGCTATATC (配列番号 22)	5'-TCTGCTATATC GTCTGGGT (配列番号 23)
Zoanthus sp.	5'- GTTCTTGAAATAGTCTACTATGT (配列番号 24)	5'-GTCTACTATGTCIT GAGGAT (配列番号 25)
Discosoma sp. "赤"	5'-CAAGCAAATGGCAAAGGTC (配列番号 26)	5'-CGGTATTGTGGCC TTCGTA (配列番号 27)
Discosoma striata	5'-TTGTCTTCTTCTGCACAAC (配列番号 28)	5'-CTGCACAACGG GTCCAT (配列番号 29)
Anemonia sulcata	5'-CCTCTATCTTCATTTCTGCTG (配列番号 30)	5'-TATCTTCATTTCTT GCGTAC (配列番号 31)
Discosoma sp. "マゼンタ"	5'-TTCAGCAOCCCATCACGAG (配列番号 32)	5'-ACGCTCAGAGCTG GGTTCC (配列番号 33)
Discosoma sp. "緑"	5'-CCCTCAGCAATCCATCACGTTT (配列番号 34)	5'-ATTATCTCAGTGGA TGGTTC (配列番号 35)

(実施例6)

(E. coliにおけるnFPの発現)

新規な蛍光タンパク質発現のためのDNA構築物を調製するために、以下の2つのプライマーを各DNAについて合成した: そのcDNAの3'-UTRに位置するアニーリング部位を有する5'指向性「下流」プライマー、および翻訳開始部位(最初のATGコドンを含まない)の部位に対応する3'指向性「上流」

(21)

特表2002-531146

プライマー（表6）。両方のプライマーは、制限エンドヌクレアーゼについての部位をコードする5'-ヒール（heel）を有した；さらに、この上流プライマーは、そのPCR産物をpQE30ベクター（Qiagen）中に、このベクターにコードされる6×HisタグとnFPのリーディングフレームの融合が生じるような様式でクローニングすることを可能にするように設計した。PCRを以下のように実施した：増幅されたcDNAサンプルの20倍希釈物1μlを反応混合物に添加した。この反応混合物は、製造業者により提供された緩衝液を含む1× Advantage KlenTaq Polymerase Mix（CLONTECH）、200μM dNTP、0.2μMの上流プライマーおよび0.2μMの下流プライマーを、最終容量20μlにて含んでいた。サイクルのプロフィールは、以下の（Hybaid OmniGene Thermocycler、チューブコントロールモード）であった：95℃で10秒、60℃で30秒、72℃で40秒を23～27サイクル。この増幅工程の産物を、フェノールクロロホルム抽出およびエタノール沈殿により精製し、次いで標準的プロトコルに従ってこのプライマーの配列に対応する制限エンドヌクレアーゼを使用して、pQE30ベクター中にクローニングした。

【0045】

すべてのプライマーを、XL-1 blue E. coli中にて増幅し、そしてプラスミドDNAミニプレップキット（CLONTECH）によって精製した。この組換えクローンを、コロニーの色によって選択し、そして3mlのLB培地（100μg/mlのアンピシリンを補充）中にて37℃で一晩増殖させた。この一晩培養物100μlを、100μg/mlのアンピシリンを含む新鮮なLB培地200mlに移し、そして37℃、200rpmにて、OD₆₀₀ 0.6～0.7まで増殖させた。次いで、1mM IPTGをこの培養物に添加し、そしてインキュベーションを、37℃でさらに16時間進行させた。この細胞を収集し、そして組換えタンパク質（N末端に6×Hisタグを組み込んでいる）を、製造業者のプロトコルに従って、TALON™金属アフィニティー樹脂（CLONTECH）を使用して精製した。

【0046】

(22)

特表2002-531146

(表6)

(発現構築物へとクローニングするためにnFPの全長コード領域を得るために使用したプライマー)

【0047】

【表6】

種	上流プライマー	下流プライマー
Anemonia majano	5'-acatggatccgctctttcaaaca agttatc (配列番号 36) BamHI	5'-tagtactcggagcttattcgta tttcagtgaatc (配列番号 37) XhoI
Clavularia sp.	L: 5'-acatggatccaacatttttga gaaacg (配列番号 38) BamHI S: 5'-acatggatccaagctctaacc accaig (配列番号 39) BamHI	5'-tagtactcggagcaacacaa accctcagacaa (配列番号 40) XhoI
Zoanthus sp.	5'-acatggatccgctcagtcacaag cacggt (配列番号 41) BamHI	5'-tagtactcggaggttgaactacat tcttatca (配列番号 42) XhoI
Discosoma sp. "赤"	5'-acatggatccaggcttccaagaat gttate (配列番号 43) BamHI	5'-tagtactcggaggccaagttc agcetta (配列番号 44) XhoI
Discosoma striata	5'-acatggatccagttggccaagagtgtg (配列番号 45) BamHI	5'-tagcggagctctatcatgcctc gtcacct (配列番号 46) SacI
Anemonia sulcata	5'-acatggatccgcttcttttaagaagact (配列番号 47) BamHI	5'-tagtactcggagtccttgggagc ggcttg (配列番号 48) XhoI
Discosoma sp. "イゼンタ"	5'-acatggatccagttgtccaagaatgtgat (配列番号 49) BamHI	5'-tagtactcggagccattacg ctaate (配列番号 50) XhoI
Discosoma sp. "緑"	5'-acatggatccagtgacttaagaagaagt (配列番号 51)	5'-tagtactcggagattcggtttaat gccttg (配列番号 52)

(実施例7)

(新規な蛍光タンパク質およびこのタンパク質をコードするcDNA)

蛍光タンパク質をコードする7つの全長cDNAを得(配列番号45~51)

、そして7つの新規な蛍光タンパク質を産生した(配列番号53~59)。これらの単離された新規な蛍光タンパク質のスペクトル特性を表7に示し、そしてこ

(23)

特表2002-531146

これらの新規なタンパク質についての発光スペクトルおよび励起スペクトルを、表3～11に示す。

【0048】

(表7)

(単離したNFPのスペクトル特性)

【0049】

【表7】

種	NFP 名	最大 吸収 nm	最大発光 nm	最大励起 係数	相対量子 収率 *	相対輝度 **
Anemonia majano	amFP486	458	486	40,000	0.3	0.43
Clavularia sp.	cFP484	456	484	35,300	0.6	0.77
Zoanthus sp.	zFP506	496	506	35,600	0.79	1.02
Zoanthus sp.	zFP538	528	538	20,200	0.52	0.38
Discosoma sp. "赤"	drFP583	558	583	22,500	0.29	0.24
Discosoma striata	dsFP483	443	483	23,900	0.57	0.50
Anemonia sulcata	asFP600	572	596	56,200	<0.001	-
Discosoma sp "赤系"	dgFP512	502	512	20,360	0.3	0.21
Discosoma sp. "マゼン"	dmFP592	573	593	21,800	0.11	0.09

* 相対量子収率は、A. victoria GFPの量子収率と比較して決定した。

** 相対輝度は、励起係数に量子収率を掛けて、A. victoria GFPについての量子収率で割ったものである。

【0050】

蛍光タンパク質の多重整列を図2Aに示す。番号付けは、Aequorea

(24)

特表2002-531146

victoriaのグリーン蛍光タンパク質 (GFP、配列番号54) に基づく。これらの新規な蛍光タンパク質のアミノ酸配列に、配列番号55～63と名付ける。Zoanthus由来の2つのタンパク質およびDiscosoma由来の4つのタンパク質を、互いの間で比較する：このシリーズの第1のタンパク質中の対応残基と同一である残基を、ダッシュによって示す。導入されたギャップを、点によって示す。A. victoria GFPの配列において、 β シートを形成するストレッチに下線を付す：側鎖がこの β -canの内側を形成する残基に影を付ける。図2Bは、cFP484のN末端部分を示す、この部分は、他のタンパク質との相同性を有さない。推定シグナルペプチドに下線を付す。

【0051】

以下の参考文献を、本明細書中に引用した。

1. Ormoら (1996) Science 273:1392～1395.
2. Yang, F. ら (1996) Nature Biotech 14:1246～1251.
3. Cormackら (1996) Gene 173, 33～38.
4. Haasら (1996) Current Biology 6, 315～324.
5. Yangら (1996) Nucleic Acids Research 24, 4592～4593.
6. Ghodaら (1990) J. Biol. Chem. 265:11823～11826.
7. Prasher D. C. ら (1992) Gene 111:229～330.
8. Kainら (1995) Biotechniques 19 (4) 650～55.
9. Chomczynski P. ら (1987) Anal. Biochem. 162, 156～159.
10. Frohmanら (1998) PNAS USA, 85, 8998～9002.

(25)

特表2002-531146

【0052】

本明細書中で言及されるいずれの特許または刊行物も、本発明が属する分野の当業者レベルの指標である。これらの特許および刊行物は、各個々の刊行物が参考として援用されると詳細かつ個別に示されたのと同じ程度に、参考として本明細書中で援用される。

【0053】

本発明が、言及された対象を実行しそして目的および利益を得るため、ならびに本発明に固有の対象を実行しそして目的および利益を得るために、十分に適合されることを、当業者は容易に理解する。これらの実施例は、本明細書中に記載の方法、手順、処理、分子、および特定の化合物とともに、好ましい実施形態の現在の代表であり、例示であり、そして本発明の範囲に対する限定としては意図されない。特許請求の範囲の範囲によって規定されるような本発明の意図内に包含される、本発明における変化および他の使用は当業者が思い付く。

【配列表】

(26)

特表2002-531146

SEQUENCE LISTING

<110> Lukyanov, Sergey A.
 Labas, Yulii A.
 Matz, Mikhail V.
 5 Pradkov, Arcady F.
 <120> Fluorescent proteins from non-bioluminescent
 species of Class Anthozoa, genes encoding such
 proteins and uses thereof
 <130> D6196PCT
 10 <141> 1999-12-10
 <150> 09/210,330
 <151> 1998-12-11
 <160> 63
 15 <210> 1
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> artificial sequence
 <220>
 20 <221> primer_bind
 <223> primer TN3 used in cDNA synthesis and RACE
 <400> 1
 cgccagtcgac cgtttttttt ttttt 25
 25 <210> 2
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> artificial sequence
 <220>
 30 <221> primer_bind
 <223> primer TS used in cDNA synthesis and RACE
 <400> 2
 aagcagtggt atcaacgcag agt 23
 35 <210> 3
 <211> 6
 <212> PRT

(27)

特表2002-531146

<213> *Aequorea victoria*
 <220>
 <222> 21
 <223> amino acid sequence of a key stretch on which
 5 primer NGH is based; Xaa at position 21
 represents unknown
 <400> 3
 Gly Xaa Val Asn Gly His
 5
 10
 <210> 4
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> artificial sequence
 15 <220>
 <221> primer_bind
 <222> 12
 <223> primer NGH used for isolation of fluorescent
 20 protein; n at position 12 represents any of the
 four bases
 <400> 4
 gayggctgcg tnaayggdca 20
 <210> 5
 25 <211> 5
 <212> PRT
 <213> *Aequorea victoria*
 <220>
 <222> 31..35
 30 <223> amino acid sequence of a key stretch on which
 primers GEGa and GEGb are based
 <400> 5
 Gly Glu Gly Glu Gly
 5
 35
 <210> 6
 <211> 20

(28)

特表2002-531146

	<212>	DNA	
	<213>	artificial sequence	
	<220>		
	<221>	primer_bind	
5	<223>	primer GEGa used for isolation of fluorescent protein	
	<400>	6	
	gttacagggtg arggmgargg		20
10	<210>	7	
	<211>	20	
	<212>	DNA	
	<213>	artificial sequence	
	<220>		
15	<221>	primer_bind	
	<223>	primer GEGb used for isolation of fluorescent protein	
	<400>	7	
	gttacagggtg arggkgargg		20
20	<210>	8	
	<211>	5	
	<212>	PRT	
	<213>	<i>Aequorea victoria</i>	
25	<220>		
	<222>	31...35	
	<223>	amino acid sequence of a key stretch on which primers GNGa and GNGb are based	
	<400>	8	
30	Gly Glu Gly Asn Gly		
		5	
	<210>	9	
	<211>	20	
35	<212>	DNA	
	<213>	artificial sequence	
	<220>		

(29)

特表2002-531146

```

<221> primer_bind
<223> primer GNGa used for isolation of fluorescent
      protein
<400> 9
5  gttacaggtg arggmaaygg                                20

<210> 10
<211> 20
<212> DNA
10 <213> artificial sequence
    <220>
    <221> primer_bind
    <223> primer GNGb used for isolation of fluorescent
          protein
15 <400> 10
    gttacaggtg arggkaaygg                                20

<210> 11
<211> 5
20 <212> PRT
    <213> Aequorea victoria
    <220>
    <222> 127..131
    <223> amino acid sequence of a key stretch on which
25 <223> primer NFP is based
    <400> 11
    Gly Met Asn Phe Pro
      5

30 <210> 12
    <211> 5
    <212> PRT
    <213> Aequorea victoria
    <220>
35 <222> 127...131
    <223> amino acid sequence of a key stretch on which
          primer NFP is based

```

(30)

特表2002-531146

	<400>	12	
	Gly Val Asn Phe Pro		
		5	
5	<210>	13	
	<211>	20	
	<212>	DNA	
	<213>	artificial sequence	
	<220>		
10	<221>	primer_bind	
	<223>	primer NFP used for isolation of fluorescent protein	
	<400>	13	
	ttccayggtr tgaaytycc		20
15			
	<210>	14	
	<211>	4	
	<212>	PRT	
	<213>	Aequorea victoria	
20	<220>		
	<222>	134..137	
	<223>	amino acid sequence of a key stretch on which primers PVMa and PVMb are based	
	<400>	14	
25	Gly Pro Val Met		
	<210>	15	
	<211>	21	
30	<212>	DNA	
	<213>	artificial sequence	
	<220>		
	<221>	primer_bind	
	<222>	15	
35	<223>	primer PVMa used for isolation of fluorescent protein; n at position 15 represents any of the	

(31)

特表2002-531146

		four bases	
	<400>	15	
	cctgccrayg gtcngtmat g		21
5	<210>	16	
	<211>	21	
	<212>	DNA	
	<213>	artificial sequence	
	<220>		
10	<221>	primer_bind	
	<222>	15	
	<223>	primer PVMb used for isolation of fluorescent protein; n at position 15 represents any of the four bases	
15	<400>	16	
	cctgccrayg gtcngtkat g		21
	<210>	17	
	<211>	47	
20	<212>	DNA	
	<213>	artificial sequence	
	<220>		
	<221>	primer_bind	
	<223>	primer T7-TN3 used in cDNA synthesis and RACE	
25	<400>	17	
	gtaatacgac tcactatagg gccgcagtcg accgtttttt tttttt		47
	<210>	18	
	<211>	45	
30	<212>	DNA	
	<213>	artificial sequence	
	<220>		
	<221>	primer_bind	
	<223>	primer T7-TS used in cDNA synthesis and RACE	
35	<400>	18	
	gtaatacgac tcactatagg gcaagcagtg gtatcaacgc agagt		45

(32)

特表2002-531146

<210> 19
 <211> 22
 <212> DNA
 5 <213> artificial sequence
 <220>
 <221> primer_bind
 <223> primer T7 used in cDNA synthesis and RACE
 <400> 19

10 gtaatagcgc tcactatagg gc 22

<210> 20
 <211> 21
 <212> DNA
 15 <213> artificial sequence
 <220>
 <221> primer_bind
 <223> gene-specific primer used for 5'-RACE for
Anemonia majano
 20 <400> 20

gaaatagtcg ggcatactgg t 21

<210> 21
 <211> 20
 25 <212> DNA
 <213> artificial sequence
 <220>
 <221> primer_bind
 <223> gene-specific primer used for 5'-RACE for
Anemonia majano
 30 <400> 21

gtcaggcata ctggtaggat 20

<210> 22
 35 <211> 21

(33)

特表2002-531146

<212> DNA
 <213> artificial sequence
 <220>
 <221> primer_bind
 5 <223> gene-specific primer used for 5'-RACE for
Clavularia sp.
 <400> 22
 cttgaaatag tctgtatat c 21
 10 <210> 23
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> artificial sequence
 <220>
 15 <221> primer_bind
 <223> gene-specific primer used for 5'-RACE for
Clavularia sp.
 <400> 23
 tctgtatat cgtctgggt 19
 20 <210> 24
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> artificial sequence
 25 <220>
 <221> primer_bind
 <223> gene-specific primer used for 5'-RACE for
Zoanthus sp.
 <400> 24
 30 gttcttgaaa tagtctacta tgt 23
 <210> 25
 <211> 20
 <212> DNA
 35 <213> artificial sequence

(34)

特表2002-531146

<220>
<221> primer_bind
<223> gene-specific primer used for 5'-RACE for
Zoanthus sp.
5 <400> 25
gtctactatg tcttgaggat 20

<210> 26
<211> 19
10 <212> DNA
<213> artificial sequence
<220>
<221> primer_bind
<223> gene-specific primer used for 5'-RACE for
15 Discosoma sp. "red"
<400> 26
caagcaaattg gcaaagggtc 19

<210> 27
20 <211> 19
<212> DNA
<213> artificial sequence
<220>
<221> primer_bind
25 <223> gene-specific primer used for 5'-RACE for
Discosoma sp. "red"
<400> 27
cgggtattgtg gccttcgta 19

30 <210> 28
<211> 19
<212> DNA
<213> artificial sequence
<220>
35 <221> primer_bind
<223> gene-specific primer used for 5'-RACE for

(35)

特表2002-531146

Discosoma striata

<400> 28

ttgtcttctt ctgcacaac 19

5 <210> 29

<211> 17

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

10 <221> primer_bind

<223> gene-specific primer used for 5'-RACE for
Discosoma striata

<400> 29

ctgcacaacg ggtccat 17

15 <210> 30

<211> 20

<212> DNA

<213> artificial sequence

20 <220>

<221> primer_bind

<223> gene-specific primer used for 5'-RACE for
Anemonia sulcata

<400> 30

25 cctctatctt catttctgc 20

<210> 31

<211> 20

<212> DNA

30 <213> artificial sequence

<220>

<221> primer_bind

<223> gene-specific primer used for 5'-RACE for
Anemonia sulcata

35 <400> 31

tatcttcatt tcctgcgtac 20

(36)

特表2002-531146

	<210>	32	
	<211>	19	
	<212>	DNA	
5	<213>	artificial sequence	
	<220>		
	<221>	primer_bind	
	<223>	gene-specific primer used for 5'-RACE for	
		<i>Discosoma sp. "magenta"</i>	
10	<400>	32	
		ttcagcacc catcacgag	19
	<210>	33	
	<211>	19	
15	<212>	DNA	
	<213>	artificial sequence	
	<220>		
	<221>	primer_bind	
	<223>	gene-specific primer used for 5'-RACE for	
		<i>Discosoma sp. "magenta"</i>	
20	<400>	33	
		acgctcagag ctgggttc	19
	<210>	34	
25	<211>	22	
	<212>	DNA	
	<213>	artificial sequence	
	<220>		
	<221>	primer_bind	
30	<223>	gene-specific primer used for 5'-RACE for	
		<i>Discosoma sp. "green"</i>	
	<400>	34	
		ccctcagcaa tccatcacgt tc	22
35	<210>	35	
	<211>	20	
	<212>	DNA	

(37)

特表2002-531146

	<213>	artificial sequence	
	<220>		
	<221>	primer_bind	
	<223>	gene-specific primer used for 5'-RACE for	
5		<i>Discosoma</i> sp. "green"	
	<400>	35	
		attatctcag tggatgggtc	20
	<210>	36	
10	<211>	31	
	<212>	DNA	
	<213>	artificial sequence	
	<220>		
	<221>	primer_bind	
15	<223>	upstream primer used to obtain full coding region	
		of nFPs from <i>Anemonia majano</i>	
	<400>	36	
		acatggatcc gctctttcaa acaagtttat c	31
20	<210>	37	
	<211>	34	
	<212>	DNA	
	<213>	artificial sequence	
	<220>		
25	<221>	primer_bind	
	<223>	downstream primer used to obtain full coding	
		region of nFPs from <i>Anemonia majano</i>	
	<400>	37	
		tagtactcga gcttattcgt atttcagtga aatc	34
30	<210>	38	
	<211>	29	
	<212>	DNA	
	<213>	artificial sequence	
35	<220>		
	<221>	primer_bind	
	<223>	upstream primer used to obtain full coding region	

(38)

特表2002-531146

of nFPs from *Clavularia* sp.

	<400>	38	
	acatggatcc aacatttttt tgagaaacg		29
5	<210>	39	
	<211>	28	
	<212>	DNA	
	<213>	artificial sequence	
	<220>		
10	<221>	primer_bind	
	<223>	upstream primer used to obtain full coding region of nFPs from <i>Clavularia</i> sp.	
	<400>	39	
	acatggatcc aaagctctaa ccaccatg		28
15	<210>	40	
	<211>	31	
	<212>	DNA	
	<213>	artificial sequence	
20	<220>		
	<221>	primer_bind	
	<223>	downstream primer used to obtain full coding region of nFPs from <i>Clavularia</i> sp.	
	<400>	40	
25	tagtactcga gcaacacaaa ccctcagaca a		31
	<210>	41	
	<211>	28	
	<212>	DNA	
30	<213>	artificial sequence	
	<220>		
	<221>	primer_bind	
	<223>	upstream primer used to obtain full coding region of nFPs from <i>Zoanthus</i> sp.	
35	<400>	41	
	acatggatcc gctcagtcaa agcacggt		28

(39)

特表2002-531146

	<210>	42	
	<211>	32	
	<212>	DNA	
5	<213>	artificial sequence	
	<220>		
	<221>	primer_bind	
	<223>	downstream primer used to obtain full coding region of nFPs from <i>Zoanthus sp.</i>	
10	<400>	42	
		tagtactcga ggttggaact acattcttat ca	32
	<210>	43	
	<211>	31	
15	<212>	DNA	
	<213>	artificial sequence	
	<220>		
	<221>	primer_bind	
	<223>	upstream primer used to obtain full coding region of nFPs from <i>Discosoma sp.</i> "red"	
20	<400>	43	
		acatggatcc aggtcttcca agaattgtat c	31
	<210>	44	
25	<211>	29	
	<212>	DNA	
	<213>	artificial sequence	
	<220>		
	<221>	primer_bind	
30	<223>	downstream primer used to obtain full coding region of nFPs from <i>Discosoma sp.</i> "red"	
	<400>	44	
		tagtactcga ggagccaagt tcagcctta	29
35	<210>	45	
	<211>	28	
	<212>	DNA	

(40)

特表2002-531146

	<213>	artificial sequence	
	<220>		
	<221>	primer_bind	
	<223>	upstream primer used to obtain full coding region	
5		of nFPs from <i>Discosoma striata</i>	
	<400>	45	
		acatggatcc agttgggtcca agagtgtg	28
	<210>	46	
10	<211>	28	
	<212>	DNA	
	<213>	artificial sequence	
	<220>		
	<221>	primer_bind	
15	<223>	downstream primer used to obtain full coding	
		region of nFPs from <i>Discosoma striata</i>	
	<400>	46	
		tagcgagctc tatcatgcct cgtcacct	28
20	<210>	47	
	<211>	31	
	<212>	DNA	
	<213>	artificial sequence	
	<220>		
25	<221>	primer_bind	
	<223>	upstream primer used to obtain full coding region	
		of nFPs from <i>Anemonia sulcata</i>	
	<400>	47	
		acatggatcc gcttcctttt taaagaagac t	31
30	<210>	48	
	<211>	28	
	<212>	DNA	
	<213>	artificial sequence	
35	<220>		
	<221>	primer_bind	
	<223>	downstream primer used to obtain full coding	

(41)

特表2002-531146

region of nFPs from *Anemonia sulcata*

<400> 48

tagtactcga gtccttgga gcggttg 28

5 <210> 49

<211> 30

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

10 <221> primer_bind

<223> upstream primer used to obtain full coding region
of nFPs from *Discosoma* sp. "magenta"

<400> 49

acatggatcc agttgttcca agaattgat 30

15 <210> 50

<211> 26

<212> DNA

<213> artificial sequence

20 <220>

<221> primer_bind

<223> downstream primer used to obtain full coding
region of nFPs from *Discosoma* sp. "magenta"

<400> 50

25 tagtactcga ggccattacg ctaatc 26

<210> 51

<211> 31

<212> DNA

30 <213> artificial sequence

<220>

<221> primer_bind

<223> upstream primer used to obtain full coding region
of nFPs from *Discosoma* sp. "green"

35 <400> 51

acatggatcc agtgcactta aagaagaaat g 31

(42)

特表2002-531146

<210> 52
 <211> 29
 <212> DNA
 5 <213> artificial sequence
 <220>
 <221> primer_bind
 <223> downstream primer used to obtain full coding
 region of nFPs from *Discosoma* sp. "green"
 10 <400> 52
 tagtactcga gattcggttt aatgccttg 29
 <210> 53
 <211> 33
 15 <212> DNA
 <213> artificial sequence
 <220>
 <221> primer_bind
 <223> TS-oligo used in cDNA synthesis and RACE
 20 <400> 53
 aagcagtggt atcaacgcag agtacgcrgr gry 33
 <210> 54
 <211> 238
 25 <212> PRT
 <213> *Aequorea victoria*
 <220>
 <223> amino acid sequence of GFP
 <400> 54
 30 Met Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu
 5 10 15
 Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser
 20 25 30
 Gly Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys
 35 35 40 45
 Phe Ile Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu
 50 55 60

(43)

特表2002-531146

	Val	Thr	Thr	Phe	Ser	Tyr	Gly	Val	Gln	Cys	Phe	Ser	Arg	Tyr	Pro	
					65					70					75	
	Asp	His	Met	Lys	Gln	His	Asp	Phe	Phe	Lys	Ser	Ala	Met	Pro	Glu	
					80					85					90	
5	Gly	Tyr	Val	Gln	Glu	Arg	Thr	Ile	Phe	Phe	Lys	Asp	Asp	Gly	Asn	
					95					100					105	
	Tyr	Lys	Thr	Arg	Ala	Glu	Val	Lys	Phe	Glu	Gly	Asp	Thr	Leu	Val	
					110					115					120	
	Asn	Arg	Ile	Glu	Leu	Lys	Gly	Ile	Asp	Phe	Lys	Glu	Asp	Gly	Asn	
10					125					130					135	
	Ile	Leu	Gly	His	Lys	Leu	Glu	Tyr	Asn	Tyr	Asn	Ser	His	Asn	Val	
					140					145					150	
	Tyr	Ile	Met	Ala	Asp	Lys	Gln	Lys	Asn	Gly	Ile	Lys	Val	Asn	Phe	
					155					160					165	
15	Lys	Ile	Arg	His	Asn	Ile	Glu	Asp	Gly	Ser	Val	Gln	Leu	Ala	Asp	
					170					175					180	
	His	Tyr	Gln	Gln	Asn	Thr	Pro	Ile	Gly	Asp	Gly	Pro	Val	Leu	Leu	
					185					190					195	
	Pro	Asp	Asn	His	Tyr	Leu	Ser	Thr	Gln	Ser	Ala	Leu	Ser	Lys	Asp	
20					200					205					210	
	Pro	Asn	Glu	Lys	Arg	Asp	His	Met	Val	Leu	Leu	Glu	Phe	Val	Thr	
					215					220					225	
	Ala	Ala	Gly	Ile	Thr	His	Gly	Met	Asp	Glu	Leu	Tyr	Lys			
					230					235						
25																
	<210>				55											
	<211>				229											
	<212>				PRT											
	<213>				<i>Anemonia majano</i>											
30	<220>															
	<223>				amino acid sequence of amFP486											
	<400>				55											
	Met	Ala	Leu	Ser	Asn	Lys	Phe	Ile	Gly	Asp	Asp	Met	Lys	Met	Thr	
					5					10					15	
35	Tyr	His	Met	Asp	Gly	Cys	Val	Asn	Gly	His	Tyr	Phe	Thr	Val	Lys	
					20					25					30	
	Gly	Glu	Gly	Asn	Gly	Lys	Pro	Tyr	Glu	Gly	Thr	Gln	Thr	Ser	Thr	
					35					40					45	

(44)

特表2002-531146

	Phe Lys Val Thr Met Ala Asn Gly Gly Pro Leu Ala Phe Ser Phe	
	50	55 60
	Asp Ile Leu Ser Thr Val Phe Lys Tyr Gly Asn Arg Cys Phe Thr	
	65	70 75
5	Ala Tyr Pro Thr Ser Met Pro Asp Tyr Phe Lys Gln Ala Phe Pro	
	80	85 90
	Asp Gly Met Ser Tyr Glu Arg Thr Phe Thr Tyr Glu Asp Gly Gly	
	95	100 105
	Val Ala Thr Ala Ser Trp Glu Ile Ser Leu Lys Gly Asn Cys Phe	
10	110	115 120
	Glu His Lys Ser Thr Phe His Gly Val Asn Phe Pro Ala Asp Gly	
	125	130 135
	Pro Val Met Ala Lys Lys Thr Thr Gly Trp Asp Pro Ser Phe Glu	
	140	145 150
15	Lys Met Thr Val Cys Asp Gly Ile Leu Lys Gly Asp Val Thr Ala	
	155	160 165
	Phe Leu Met Leu Gln Gly Gly Gly Asn Tyr Arg Cys Gln Phe His	
	170	175 180
	Thr Ser Tyr Lys Thr Lys Lys Pro Val Thr Met Pro Pro Asn His	
20	185	190 195
	Val Val Glu His Arg Ile Ala Arg Thr Asp Leu Asp Lys Gly Gly	
	200	205 210
	Asn Ser Val Gln Leu Thr Glu His Ala Val Ala His Ile Thr Ser	
	215	220 225
25	Val Val Pro Phe	

	<210>	56
	<211>	266
30	<212>	PRT
	<213>	Clavularia sp.
	<220>	
	<223>	amino acid sequence of cFP484
	<400>	56
35	Met Lys Cys Lys Phe Val Phe Cys Leu Ser Phe Leu Val Leu Ala	
	5	10 15
	Ile Thr Asn Ala Asn Ile Phe Leu Arg Asn Glu Ala Asp Phe Glu	

(45)

特表2002-531146

		20		25		30
		Glu Lys Thr Phe Arg Ile Pro Lys Ala Leu Thr Thr Met Gly Val				
		35		40		45
		Ile Lys Pro Asp Met Lys Ile Lys Leu Lys Met Glu Gly Asn Val				
5		50		55		60
		Asn Gly His Ala Phe Val Ile Glu Gly Glu Gly Glu Gly Lys Pro				
		65		70		75
		Tyr Asp Gly Thr His Thr Leu Asn Leu Glu Val Lys Glu Gly Ala				
		80		85		90
10		Pro Leu Pro Phe Ser Tyr Asp Ile Leu Ser Asn Ala Phe Gln Tyr				
		95		100		105
		Gly Asn Arg Ala Leu Thr Lys Tyr Pro Asp Asp Ile Ala Asp Tyr				
		110		115		120
		Phe Lys Gln Ser Phe Pro Glu Gly Tyr Ser Trp Glu Arg Thr Met				
15		125		130		135
		Thr Phe Glu Asp Lys Gly Ile Val Lys Val Lys Ser Asp Ile Ser				
		140		145		150
		Met Glu Glu Asp Ser Phe Ile Tyr Glu Ile Arg Phe Asp Gly Met				
		155		160		165
20		Asp Phe Pro Pro Asn Gly Pro Val Met Gln Lys Lys Thr Leu Lys				
		170		175		180
		Trp Glu Pro Ser Thr Glu Ile Met Tyr Val Arg Asp Gly Val Leu				
		185		190		195
		Val Gly Asp Ile Ser His Ser Leu Leu Leu Glu Gly Gly Gly His				
25		200		205		210
		Tyr Arg Cys Asp Phe Lys Ser Ile Tyr Lys Ala Lys Lys Val Val				
		215		220		225
		Lys Leu Pro Asp Tyr His Phe Val Asp His Arg Ile Glu Ile Leu				
		230		235		240
30		Asn His Asp Lys Asp Tyr Asn Lys Val Thr Leu Tyr Glu Asn Ala				
		245		250		255
		Val Ala Arg Tyr Ser Leu Leu Pro Ser Gln Ala				
		260		265		
35	<210>	57				
	<211>	230				
	<212>	PRT				

(46)

特表2002-531146

<213> *Zoanthus sp.*
 <220>
 <223> amino acid sequence of zFP506
 <400> 57

5	Ala Gln Ser Lys His Gly Leu Thr Lys Glu Met Thr Met Lys Tyr		
	5	10	15
	Arg Met Glu Gly Cys Val Asp Gly His Lys Phe Val Ile Thr Gly		
	20	25	30
	Glu Gly Ile Gly Tyr Pro Phe Lys Gly Lys Gln Ala Ile Asn Leu		
10	35	40	45
	Cys Val Val Glu Gly Gly Pro Leu Pro Phe Ala Glu Asp Ile Leu		
	50	55	60
	Ser Ala Ala Phe Asn Tyr Gly Asn Arg Val Phe Thr Glu Tyr Pro		
	65	70	75
15	Gln Asp Ile Val Asp Tyr Phe Lys Asn Ser Cys Pro Ala Gly Tyr		
	80	85	90
	Thr Trp Asp Arg Ser Phe Leu Phe Glu Asp Gly Ala Val Cys Ile		
	95	100	105
	Cys Asn Ala Asp Ile Thr Val Ser Val Glu Glu Asn Cys Met Tyr		
20	110	115	120
	His Glu Ser Lys Phe Tyr Gly Val Asn Phe Pro Ala Asp Gly Pro		
	125	130	135
	Val Met Lys Lys Met Thr Asp Asn Trp Glu Pro Ser Cys Glu Lys		
	140	145	150
25	Ile Ile Pro Val Pro Lys Gln Gly Ile Leu Lys Gly Asp Val Ser		
	155	160	165
	Met Tyr Leu Leu Leu Lys Asp Gly Gly Arg Leu Arg Cys Gln Phe		
	170	175	180
	Asp Thr Val Tyr Lys Ala Lys Ser Val Pro Arg Lys Met Pro Asp		
30	185	190	195
	Trp His Phe Ile Gln His Lys Leu Thr Arg Glu Asp Arg Ser Asp		
	200	205	210
	Ala Lys Asn Gln Lys Trp His Leu Thr Glu His Ala Ile Ala Ser		
	215	220	225
35	Gly Ser Ala Leu Pro		
	230		

(47)

特表2002-531146

	<210>	58	
	<211>	230	
	<212>	PRT	
5	<213>	<i>Zoanthus sp.</i>	
	<220>		
	<223>	amino acid sequence of zFP538	
	<400>	58	
	Met Ala His Ser Lys His Gly Leu Lys Glu Glu Met Thr Met Lys		
10		5 10 15	
	Tyr His Met Glu Gly Cys Val Asn Gly His Lys Phe Val Ile Thr		
		20 25 30	
	Gly Glu Gly Ile Gly Tyr Pro Phe Lys Gly Lys Gln Thr Ile Asn		
		35 40 45	
15	Leu Cys Val Ile Glu Gly Gly Pro Leu Pro Phe Ser Glu Asp Ile		
		50 55 60	
	Leu Ser Ala Gly Phe Lys Tyr Gly Asp Arg Ile Phe Thr Glu Tyr		
		65 70 75	
	Pro Gln Asp Ile Val Asp Tyr Phe Lys Asn Ser Cys Pro Ala Gly		
20		80 85 90	
	Tyr Thr Trp Gly Ser Phe Leu Phe Glu Asp Gly Ala Val Cys Ile		
		95 100 105	
	Cys Asn Val Asp Ile Thr Val Ser Val Lys Glu Asn Cys Ile Tyr		
		110 115 120	
25	His Lys Ser Ile Phe Asn Gly Met Asn Phe Pro Ala Asp Gly Pro		
		125 130 135	
	Val Met Lys Lys Met Thr Thr Asn Trp Glu Ala Ser Cys Glu Lys		
		140 145 150	
	Ile Met Pro Val Pro Lys Gln Gly Ile Leu Lys Gly Asp Val Ser		
30		155 160 165	
	Met Tyr Leu Leu Leu Lys Asp Gly Gly Arg Tyr Arg Cys Gln Phe		
		170 175 180	
	Asp Thr Val Tyr Lys Ala Lys Ser Val Pro Ser Lys Met Pro Glu		
		185 190 195	
35	Trp His Phe Ile Gln His Lys Leu Leu Arg Glu Asp Arg Ser Asp		
		200 205 210	
	Ala Lys Asn Gln Lys Trp Gln Leu Thr Glu His Ala Ile Ala Phe		
		215 220 225	

特表2002-531146

230

5	<210>	59
	<211>	232
	<212>	PRT
	<213>	<i>Discosoma striata</i>
	<220>	
10	<223>	amino acid sequence of dsFP483
	<400>	59

	Met	Ser	Cys	Ser	Lys	Ser	Val	Ile	Lys	Glu	Glu	Met	Leu	Ile	Asp
					5					10					15
15	Leu	His	Leu	Glu	Gly	Thr	Phe	Asn	Gly	His	Tyr	Phe	Glu	Ile	Lys
					20					25					30
	Gly	Lys	Gly	Lys	Gly	Gln	Pro	Asn	Glu	Gly	Thr	Asn	Thr	Val	Thr
					35					40					45
	Leu	Glu	Val	Thr	Lys	Gly	Gly	Pro	Leu	Pro	Phe	Gly	Trp	His	Ile
					50					55					60
20	Leu	Cys	Pro	Gln	Phe	Gln	Tyr	Gly	Asn	Lys	Ala	Phe	Val	His	His
					65					70					75
	Pro	Asp	Asn	Ile	His	Asp	Tyr	Leu	Lys	Leu	Ser	Phe	Pro	Glu	Gly
					80					85					90
25	Tyr	Thr	Trp	Glu	Arg	Ser	Met	His	Phe	Glu	Asp	Gly	Gly	Leu	Cys
					95					100					105
	Cys	Ile	Thr	Asn	Asp	Ile	Ser	Leu	Thr	Gly	Asn	Cys	Phe	Tyr	Tyr
					110					115					120
	Asp	Ile	Lys	Phe	Thr	Gly	Leu	Asn	Phe	Pro	Pro	Asn	Gly	Pro	Val
					125					130					135
30	Val	Gln	Lys	Lys	Thr	Thr	Gly	Trp	Glu	Pro	Ser	Thr	Glu	Arg	Leu
					140					145					150
	Tyr	Pro	Arg	Asp	Gly	Val	Leu	Ile	Gly	Asp	Ile	His	His	Ala	Leu
					155					160					165
	Thr	Val	Glu	Gly	Gly	Gly	His	Tyr	Ala	Cys	Asp	Ile	Lys	Thr	Val
35					170					175					180
	Tyr	Arg	Ala	Lys	Lys	Ala	Ala	Leu	Lys	Met	Pro	Gly	Tyr	His	Tyr
					185					190					195

(49)

特表2002-531146

	Val Asp Thr Lys Leu Val Ile Trp Asn Asn Asp Lys Glu Phe Met	
	200	205 210
	Lys Val Glu Glu His Glu Ile Ala Val Ala Arg His His Pro Phe	
	215	220 225
5	Tyr Glu Pro Lys Lys Asp Lys	
	230	
	<210>	60
	<211>	225
10	<212>	PRT
	<213>	<i>Discosoma</i> sp. "red"
	<220>	
	<223>	amino acid sequence of drFP583
	<400>	60
15	Met Arg Ser Ser Lys Asn Val Ile Lys Glu Phe Met Arg Phe Lys	
	5	10 15
	Val Arg Met Glu Gly Thr Val Asn Gly His Glu Phe Glu Ile Glu	
	20	25 30
	Gly Glu Gly Glu Gly Arg Pro Tyr Glu Gly His Asn Thr Val Lys	
20	35	40 45
	Leu Lys Val Thr Lys Gly Gly Pro Leu Pro Phe Ala Trp Asp Ile	
	50	55 60
	Leu Ser Pro Gln Phe Gln Tyr Gly Ser Lys Val Tyr Val Lys His	
	65	70 75
25	Pro Ala Asp Ile Pro Asp Tyr Lys Lys Leu Ser Phe Pro Glu Gly	
	80	85 90
	Phe Lys Trp Glu Arg Val Met Asn Phe Glu Asp Gly Gly Val Val	
	95	100 105
	Thr Val Thr Gln Asp Ser Ser Leu Gln Asp Gly Cys Phe Ile Tyr	
30	110	115 120
	Lys Val Lys Phe Ile Gly Val Asn Phe Pro Ser Asp Gly Pro Val	
	125	130 135
	Met Gln Lys Lys Thr Met Gly Trp Glu Ala Ser Thr Glu Arg Leu	
	140	145 150
35	Tyr Pro Arg Asp Gly Val Leu Lys Gly Glu Ile His Lys Ala Leu	
	155	160 165
	Lys Leu Lys Asp Gly Gly His Tyr Leu Val Glu Phe Lys Ser Ile	
	170	175 180

(50)

特表2002-531146

	Tyr Met Ala Lys Lys Pro Val Gln Leu Pro Gly Tyr Tyr Tyr Val	
	185	190 195
	Asp Ser Lys Leu Asp Ile Thr Ser His Asn Glu Asp Tyr Thr Ile	
	200	205 210
5	Val Glu Gln Tyr Glu Arg Thr Glu Gly Arg His His Leu Phe Leu	
	215	220 225
	<210> 61	
	<211> 232	
10	<212> PRT	
	<213> <i>Anemonia sulcata</i>	
	<220>	
	<223> amino acid sequence of asFP600	
	<400> 61	
15	Met Ala Ser Phe Leu Lys Lys Thr Met Pro Phe Lys Thr Thr Ile	
	5	10 15
	Glu Gly Thr Val Asn Gly His Tyr Phe Lys Cys Thr Gly Lys Gly	
	20	25 30
	Glu Gly Asn Pro Phe Glu Gly Thr Gln Glu Met Lys Ile Glu Val	
20	35	40 45
	Ile Glu Gly Gly Pro Leu Pro Phe Ala Phe His Ile Leu Ser Thr	
	50	55 60
	Ser Cys Met Tyr Gly Ser Lys Thr Phe Ile Lys Tyr Val Ser Gly	
	65	70 75
25	Ile Pro Asp Tyr Phe Lys Gln Ser Phe Pro Glu Gly Phe Thr Trp	
	80	85 90
	Glu Arg Thr Thr Thr Tyr Glu Asp Gly Gly Phe Leu Thr Ala His	
	95	100 105
	Gln Asp Thr Ser Leu Asp Gly Asp Cys Leu Val Tyr Lys Val Lys	
30	110	115 120
	Ile Leu Gly Asn Asn Phe Pro Ala Asp Gly Pro Val Met Gln Asn	
	125	130 135
	Lys Ala Gly Arg Trp Glu Pro Ala Thr Glu Ile Val Tyr Glu Val	
	140	145 150
35	Asp Gly Val Leu Arg Gly Gln Ser Leu Met Ala Leu Lys Cys Pro	
	155	160 165
	Gly Gly Arg His Leu Thr Cys His Leu His Thr Thr Tyr Arg Ser	
	170	175 180

(51)

特表2002-531146

Lys Lys Pro Ala Ser Ala Leu Lys Met Pro Gly Phe His Phe Glu
 185 190 195
 Asp His Arg Ile Glu Ile Met Glu Glu Val Glu Lys Gly Lys Cys
 200 205 210
 5 Tyr Lys Gln Tyr Glu Ala Ala Val Gly Arg Tyr Cys Asp Ala Ala
 215 220 225
 Pro Ser Lys Leu Gly His Asn
 230

10 <210> 62
 <211> 231
 <212> PRT
 <213> *Discosoma* sp. "green"
 <220>
 15 <223> amino acid sequence of dgFP512
 <400> 62

Met Ser Ala Leu Lys Glu Glu Met Lys Ile Asn Leu Thr Met Glu
 5 10 15
 Gly Val Val Asn Gly Leu Pro Phe Lys Ile Arg Gly Asp Gly Lys
 20 20 25 30
 Gly Lys Pro Tyr Gln Gly Ser Gln Glu Leu Thr Leu Thr Val Val
 35 40 45
 Lys Gly Gly Pro Leu Pro Phe Ser Tyr Asp Ile Leu Thr Thr Met
 50 55 60
 25 Phe Gln Tyr Gly Asn Arg Ala Phe Val Asn Tyr Pro Glu Asp Ile
 65 70 75
 Pro Asp Ile Phe Lys Gln Thr Cys Ser Gly Pro Asn Gly Gly Tyr
 80 85 90
 Ser Trp Gln Arg Thr Met Thr Tyr Glu Asp Gly Gly Val Cys Thr
 30 95 100 105
 Ala Thr Ser Asn Ile Ser Val Val Gly Asp Thr Phe Asn Tyr Asp
 110 115 120

(52)

特表2002-531146

	Ile His Phe Met Gly Ala Asn Phe Pro Leu Asp Gly Pro Val Met	
	125	130 135
	Gln Lys Arg Thr Met Lys Trp Glu Pro Ser Thr Glu Ile Met Phe	
	140	145 150
5	Glu Arg Asp Gly Met Leu Arg Gly Asp Ile Ala Met Ser Leu Leu	
	155	160 165
	Leu Lys Gly Gly Gly His Tyr Arg Cys Asp Phe Glu Thr Ile Tyr	
	170	175 180
	Lys Pro Asn Lys Val Val Lys Met Pro Asp Tyr His Phe Val Asp	
10	185	190 195
	His Cys Ile Glu Ile Thr Ser Gln Gln Asp Tyr Tyr Asn Val Val	
	200	205 210
	Glu Leu Thr Glu Val Ala Glu Ala Arg Tyr Ser Ser Leu Glu Lys	
	215	220 225
15	Ile Gly Lys Ser Lys Ala	
	230	
	<210> 63	
	<211> 235	
20	<212> PRT	
	<213> <i>Discosoma</i> sp. "magenta"	
	<220>	
	<223> amino acid sequence of dmFP592	
	<400> 63	
25	Met Ser Cys Ser Lys Asn Val Ile Lys Glu Phe Met Arg Phe Lys	
	5	10 15
	Val Arg Met Glu Gly Thr Val Asn Gly His Glu Phe Glu Ile Lys	
	20	25 30
	Gly Glu Gly Glu Gly Arg Pro Tyr Glu Gly His Cys Ser Val Lys	
30	35	40 45

(53)

特表2002-531146

	Leu Met Val Thr Lys Gly Gly Pro Leu Pro Phe Ala Phe Asp Ile		
	50	55	60
	Leu Ser Pro Gln Phe Gln Tyr Gly Ser Lys Val Tyr Val Lys His		
	65	70	75
5	Pro Ala Asp Ile Pro Asp Tyr Lys Lys Leu Ser Phe Pro Glu Gly		
	80	85	90
	Phe Lys Trp Glu Arg Val Met Asn Phe Glu Asp Gly Gly Val Val		
	100	105	110
	Thr Val Ser Gln Asp Ser Ser Leu Lys Asp Gly Cys Phe Ile Tyr		
10	115	120	125
	Glu Val Lys Phe Ile Gly Val Asn Phe Pro Ser Asp Gly Pro Val		
	130	135	140
	Met Gln Arg Arg Thr Arg Gly Trp Glu Ala Ser Ser Glu Arg Leu		
	145	150	155
15	Tyr Pro Arg Asp Gly Val Leu Lys Gly Asp Ile His Met Ala Leu		
	160	165	170
	Arg Leu Glu Gly Gly Gly His Tyr Leu Val Glu Phe Lys Ser Ile		
	175	180	185
	Tyr Met Val Lys Lys Pro Ser Val Gln Leu Pro Gly Tyr Tyr Tyr		
20	190	195	200
	Val Asp Ser Lys Leu Asp Met Thr Ser His Asn Glu Asp Tyr Thr		
	205	210	215
	Val Val Glu Gln Tyr Glu Lys Thr Gln Gly Arg His His Pro Phe		
	220	225	230
25	Ile Lys Pro Leu Gln		
	235		

【図面の簡単な説明】

【図1】

図1は、標的フラグメントを単離するために使用される3'-RACEの改変されたストラテジーを示す。使用されたオリゴヌクレオチドの配列を表2に示す。Dp1およびDp2は、第1および第2のPCRにおいてそれぞれ使用された縮重プライマーである（縮重プライマーの配列については、表3および表4を参

(54)

特表2002-531146

照のこと)。

【図2】

図2Aは、新規な蛍光タンパク質の多重アラインメントを示す。番号付けは、*Aequorea victoria* グリーン蛍光タンパク質 (GFP) に基づく。*Zoanthus* 由来の2つのタンパク質および *Discosoma* 由来の4つのタンパク質を、互いの間で比較する：シリーズの第1のタンパク質中の残基と一致する残基と同一の残基を、ダッシュで表す。導入したギャップをドットで表す。*A. victoria* GFPの配列において、 β シートを形成するストレッチに下線を付す；側鎖が β -canの内部を形成する残基に影を付ける (Yangら、*Nature Biotechnol.* 14, 1246-1251 (1996) に従う)。図2Bは、cFP484のN末端部分を示し、これは、他のタンパク質とは相同性を有さない。推定シグナルペプチドに下線を付す。

【図3】

図3は、*Anemonia majano*、amFP486由来の新規な蛍光タンパク質の励起および発光スペクトルを示す。

【図4】

図4は、*Clavularia*、cFP484由来の新規な蛍光タンパク質の励起および発光スペクトルを示す。

【図5】

図5は、*Zoanthus*、zFP506由来の新規な蛍光タンパク質の励起および発光スペクトルを示す。

【図6】

図6は、*Zoanthus*、zFP538由来の新規な蛍光タンパク質の励起および発光スペクトルを示す。

【図7】

図7は、*Discosoma striata*、dsFP483由来の新規な蛍光タンパク質の励起および発光スペクトルを示す。

【図8】

図8は、*Discosoma*、drFP583由来の新規な蛍光タンパク質の

(55)

特表2002-531146

励起および発光スペクトルを示す。

【図 9】

図9は、*Anemonia sulcata*、asFP600由来の新規な蛍光タンパク質の励起および発光スペクトルを示す。

【図 10】

図10は、*Discosoma*、dgFP512由来の新規な蛍光タンパク質の励起および発光スペクトルを示す。

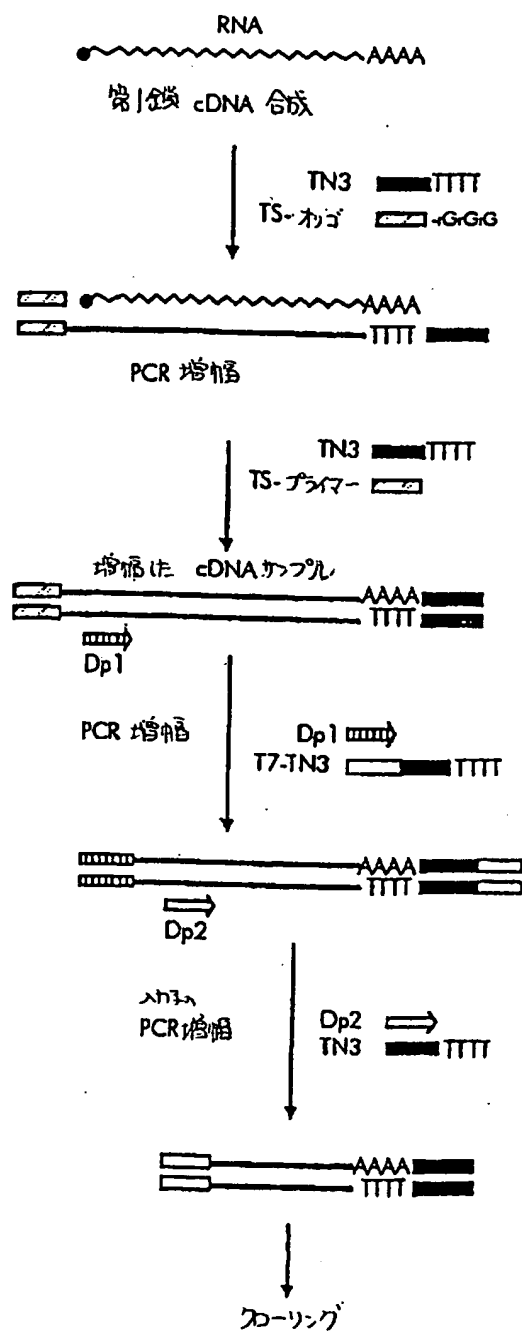
【図 11】

図11は、*Discosoma*、dmFP592由来の新規な蛍光タンパク質の励起および発光スペクトルを示す。

(56)

特表2002-531146

【図1】



(57)

特表2002-531146

【図 2 A】

10	20	30	40	50	SEQ ID#
MSKGEELFTG.VVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEDATY	GKLTLLKFICTT.GKLPVP..W	GFP			54
MAQSKHGLTK.EHTMKYRMEGCVGDKHKEVITGEGIGYPFKGKQAINLCVV..EGGPLPFAE	zFP506				57
--H-----KE-----H-----N-----T-----I-----S-	zFP538				58
MSWSKSVIKE.EHLIDLHLEGTFNHGYFEIKGKKGKPNEGTNTVLEVT..KGGPLPFGW	dsFP483				59
...H-AL--.Y-K-N-TM--VV--LP-K-R-D-----YO-SOEL--T-V..-----SY	dgFP512				62
-RS--N-----F-RFKVRM--V--E--E-E-R-Y--H--K-K--.....A-	drFP583				60
M-C--N-----F-RFKVRM--V--E--E-E-R-Y--HCS-K-H--.....AF	dmFP592				63
...MASFLKK.THPFKTTIEGTVNGHYFKCTGKGEKNPFEGTQEMKIEVI..EGGPLPFAF	asFP600				61
MALSNKFIGD.DHKMTYIIMDGCVINHYFTVKGEKNPKPYEGTQTSTFKVTHANGGPLAFSF	amFP486				55
QALTTMGVIKPDMKIKLKMENGVNGHAFVIEGEGGKPYDGTHTLNLEVKMAEGAPLPFSY	cFP484				56
60	70	80	90	100	110
PTLVTTFSYGVOCFSRYPDHMKOHDFKFSAM...PEGVVOERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGD..	GFP				
DILSAAFNYGHRVFEYPODIV..DYFKNSC...PAGYTNDRSFLFEDGAVCICNADITVSVEEN	zFP506				
----G-K--D-I-----G-----V-----K--	zFP538				
HILCPQFYGNKAFVHHPDDIP..DYLKLSF...PEGYTWSRSHHFDGGLCCITNDISLTGN..	dsFP483				
D--TTH-----R--NY-E--...-IF-QTCSGPNG--S-Q-T-TY--V-TA-SN--VV-O..	dgFP512				
D--S-----S-VY-K-A--...-K-----FK--V-N-----VTV-Q-S--QDG..	drFP583				
D--S-----S-VY-K-A--...-K-----FK--V-N-----VTVSQ-S--KDG..	dmFP592				
HILSTSCMYGSKTFIKYVSGIP..DYFKQSF...PEGFTWERTTTTYEDGGFLTAHQDTSLDGD..	asFP600				
DILSTVFKYGNRCFTAYPTSHP..DYFKQAF...PDGMSYERTFTYEDGGVATASWEISLKGH..	amFP486				
DILSNAFYGNRALTYPDDIA..DYFKQSF...PEGYSWERTMTFEDKGIVKVKSDISMEED..	cFP484				
120	130	140	150	160	170
TLVNRIELKGIQDFKEDGNILGHKLEYNYNHNVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEUGSVQL	GFP				
CHYHESKFYGVNFPADGPVM.KKMTDNWEPSCETII PVPKOGILKGDVSMYLLIKDGGRI.R	zFP506				
-I--K-I-N-M-----T--A--M-----Y-	zFP538				
CENYDIKFTGLNFPNGPVV.QKKTGHEPSTERLYP..RDGVLIGDIHHALTVEGGGHYV	dsFP483				
T-----H-M-A--LD--MM--R-MK-----IMFE ---L-R-D-AMS-LLK-----R	dgFP512				
--I-KV--I-V--SD--M--M--A-----K-E--K--KLKD--L	drFP583				
--I-EV--I-V--SD--M--RR-R--S-----K--M--RL--L	dmFP592				
CLVYKVKILGNFPADGPVM.QNKAGRHEPATEIVYE..VDGVLRGQSLMALKCPGGRHLT	asFP600				
CFEHKSFTFGVNFADGPVM.AKKTGNDPSEKMTV..CDGILKGDVTAFLMLQGGGNYR	amFP486				
SFIYEIREDGHNFPNGPVV.QKKTLEPSTEIHYV..RDGVLVGDISHSLLLEGGGHYR	cFP484				
180	190	200	210	220	230
ADHYQONTPIGOG.PVLLPDNHLYLSTQSALSKDPNEKRDNHVLLEFVTAAGITHGMDELYK	GFP				
COFDTVYKAKSV..PRKMPDWHFIQHKLTREDSDAKNQKNHLTEHAIASGSALP	zFP506				
-----S--E-----L-----Q-----FP--A	zFP538				
CDIKTVYQAKK...PVKMPGYHYVDTKLVIRSNOKEEM.KVEHEIAVARHHPLOSO	dsFP483				
--FE-I-KPN- V-----D--F--HYIE-T-QQNYYN V--LT-V-E--YSS-EKIGSKA	dgFP512				
VEF-SI-N-----QL--Y--S--D-T-HNEDYT.I--QY-RTEG--LFL	drFP583				
VEF-SI-MV-- PS-QL--Y--S--DMT-HNEDYT V--QY-KTO-----FIKPLQ	dmFP592				
CHLHTTYRSKKPASALKMPGFHFEHRIEIMEEVEKKGK.CYKQYEAAGVGRYCDAAAPSKLGHN	asFP600				
COFHTSYKTKK...PVTMPNHHVVEHRIARTDLKGGN.SVOLTEHAVAHITSVFPF	amFP486				
CDFKSIYKAKK...VVKLPDYHFDHRIEILNHDKDN.KVTLYENAVARYSLLPSQA	cFP484				

FIG. 2A

【図 2 B】

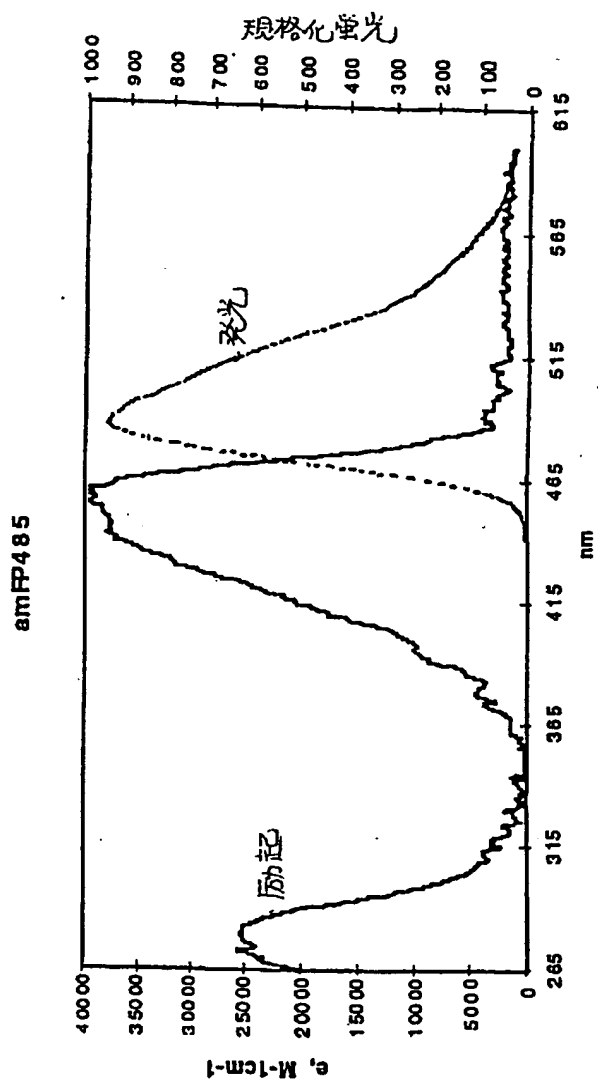
MKCKFVFLSFLVLAITNANIFLRNEADLEEKTLRIP

FIG. 2B

(58)

特表2002-531146

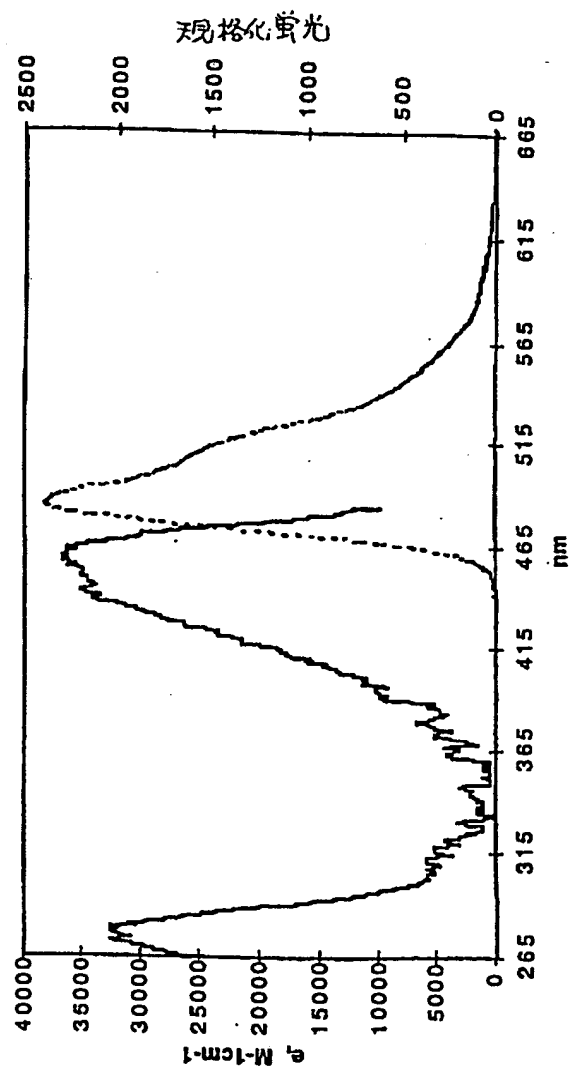
【図3】



(59)

特表2002-531146

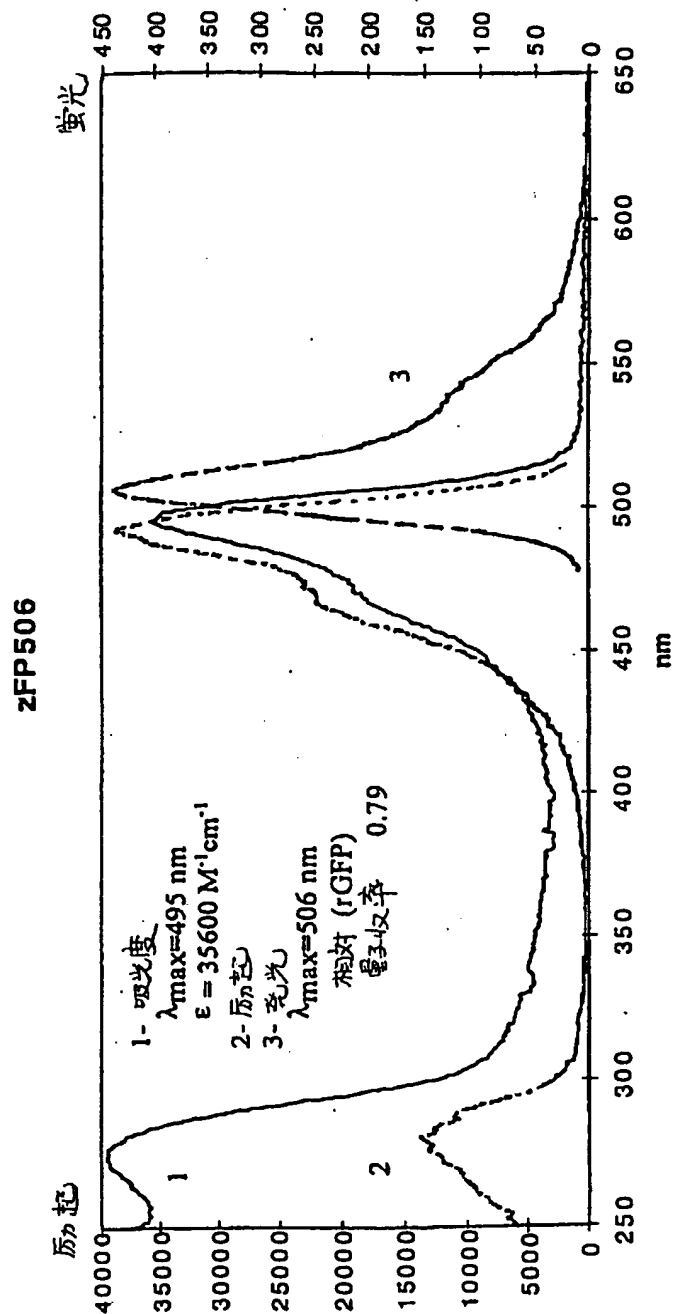
【図4】



(60)

特表2002-531146

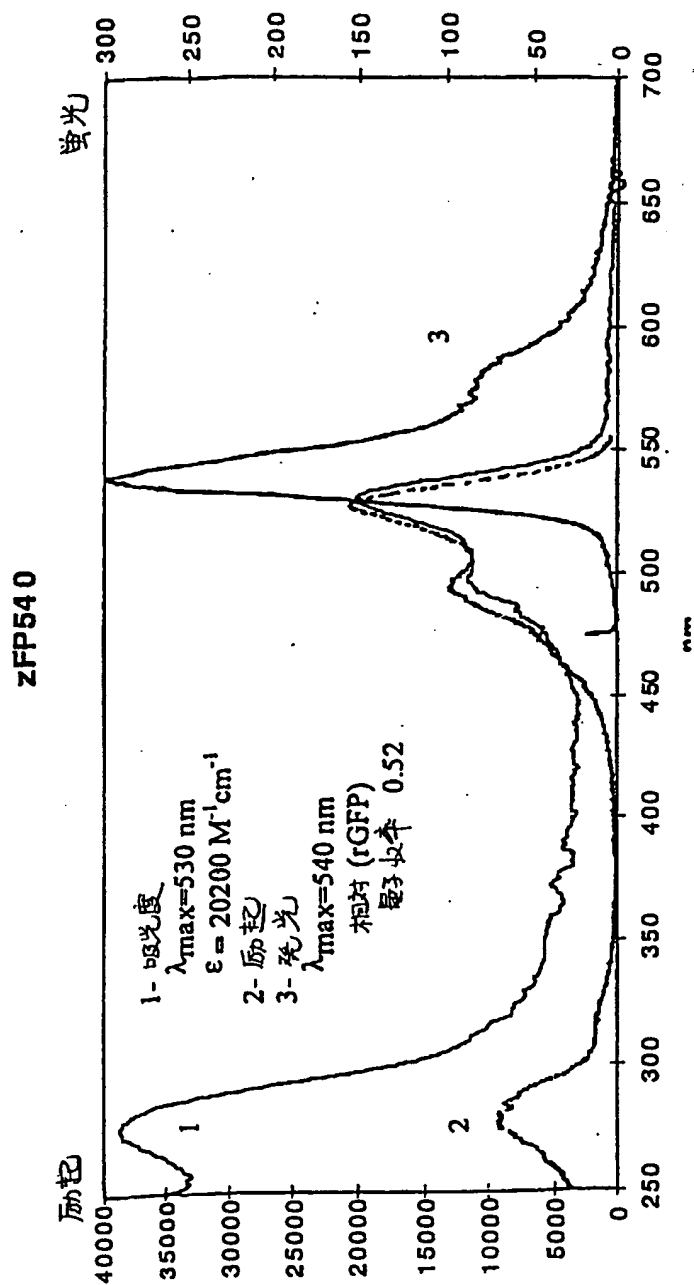
【図5】



(61)

特表2002-531146

【图6】

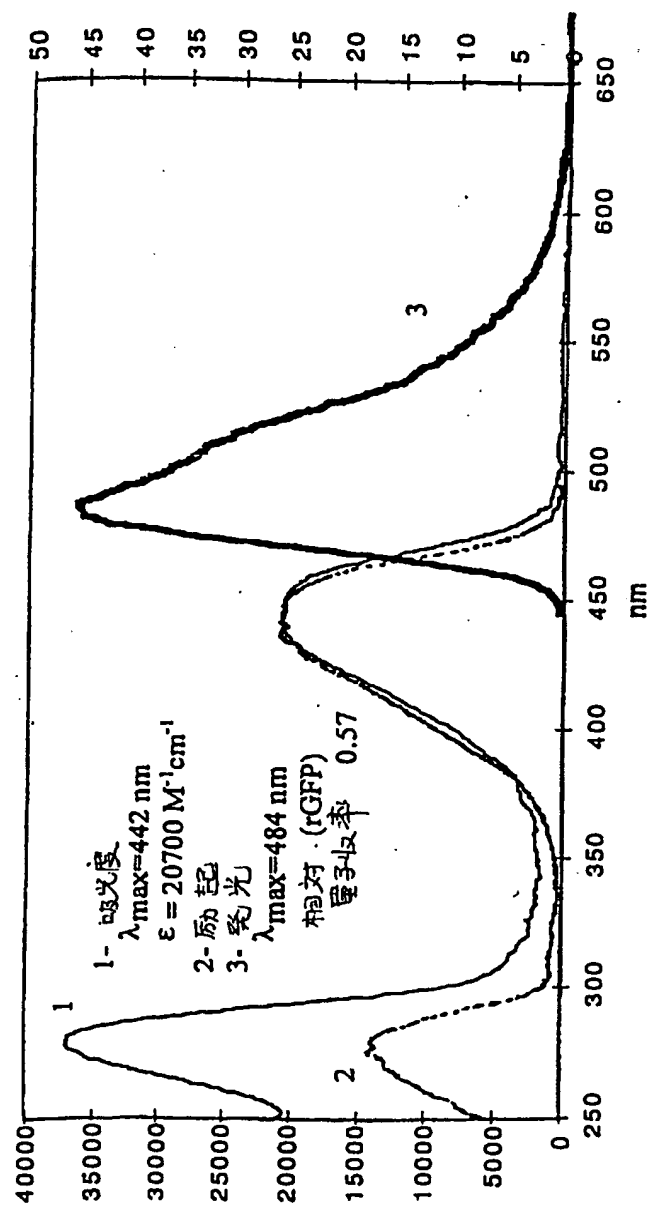


(62)

特表2002-531146

【図 7】

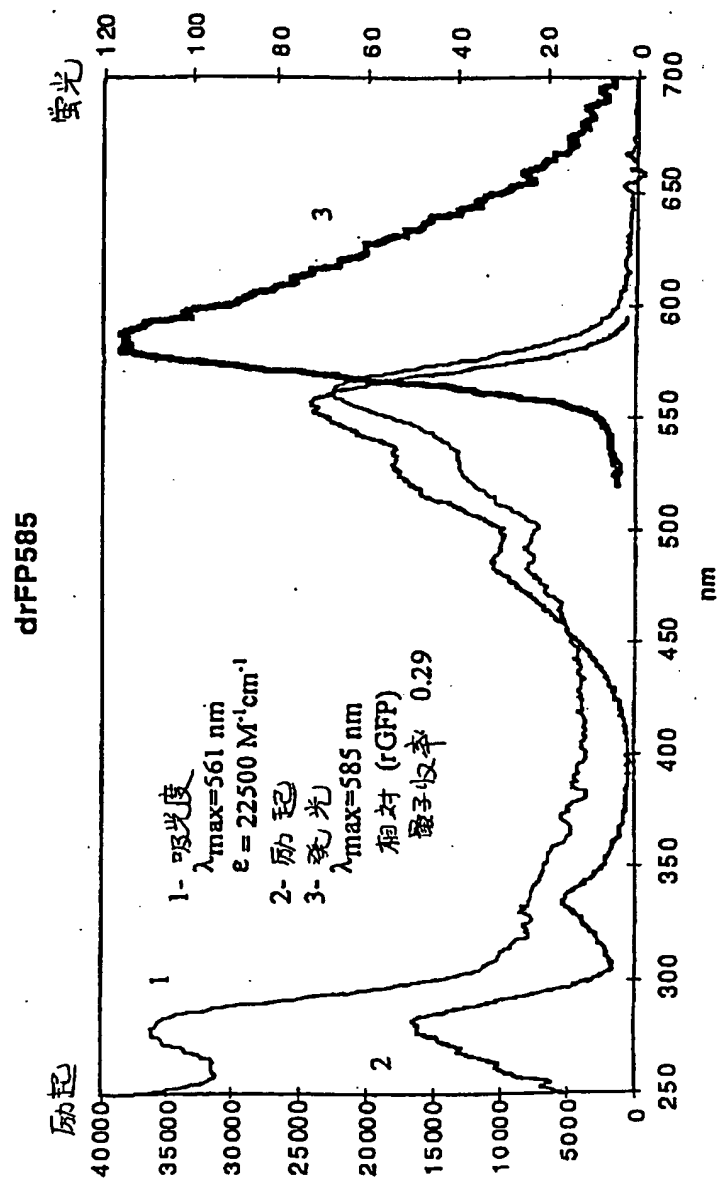
dsFP484



(63)

特表2002-531146

【图 8】



(64)

特表2002-531146

【図9】

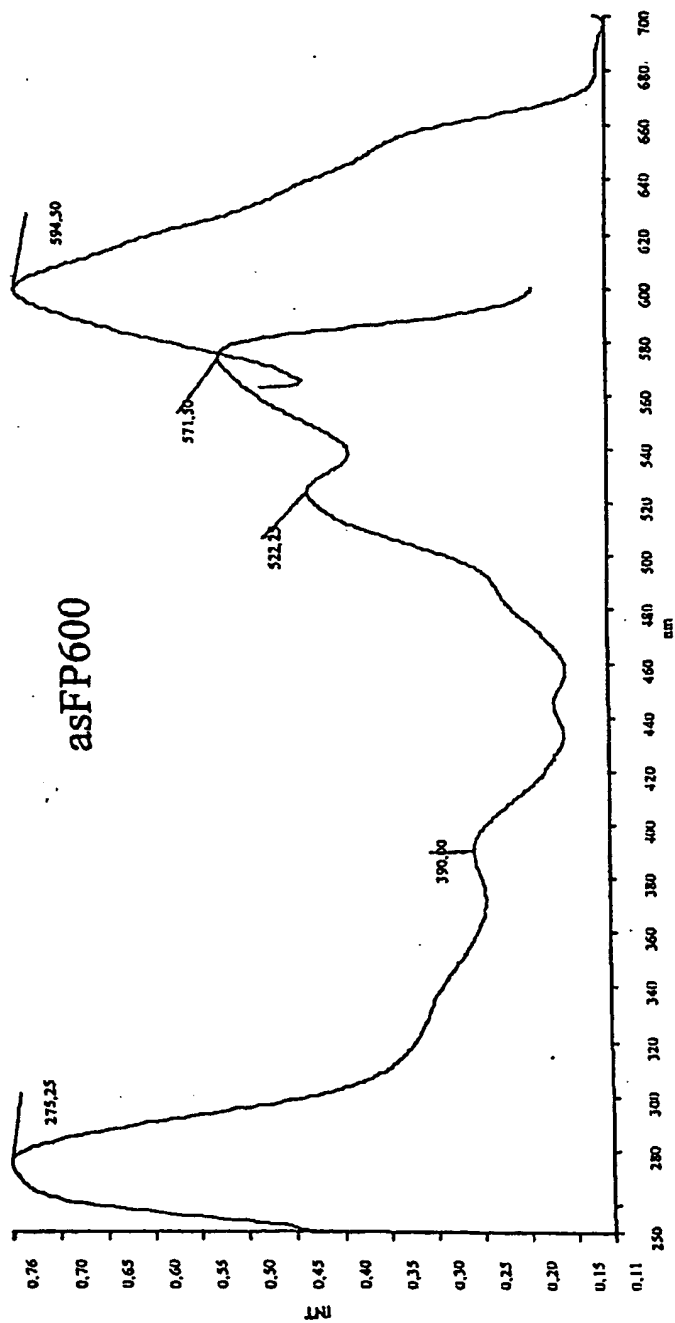


FIG. 9

(65)

特表2002-531146

【図10】

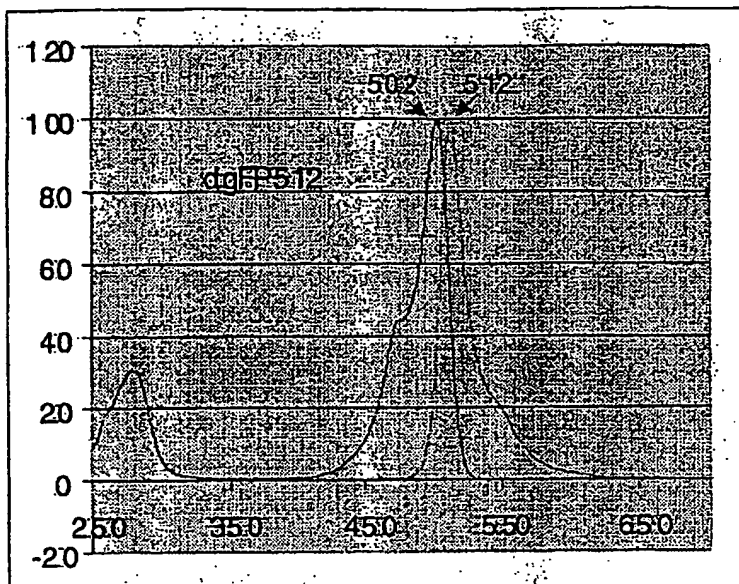


Fig. 10

(66)

特表2002-531146

【図11】

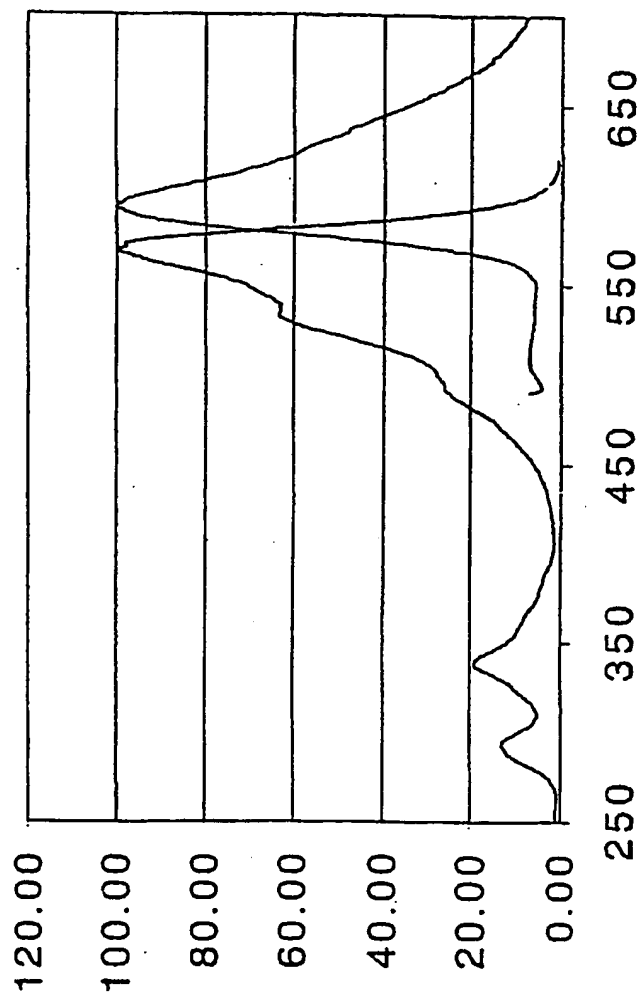


FIG. 11

(67)

特表2002-531146

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US99/29403

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(7) : C12Q 1/68; C07K 14433 US CL : 435/6, 69.1; 530/350 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 435/6, 69.1, 968; 530/350; 424/9.6, 436/172 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Please See Extra Sheet		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
***	The sequence diskette submitted with the description was defective; thus the references listed below were obtained solely by a WORD search, and not by a search of the SEQ ID NOs.	***
X, P	MATZ et al. Fluorescent proteins from nonbioluminescent Anthozoa species. Nature Biotechnology. October 1999, Volume 17, No. 10, pages 969-973, entire document.	1-10
X, P	DE 197 18 640 A1 (WIEDENMANN) 22 July 1999, entire document.	3-10
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "B" earlier document published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "U" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is considered with one or more other such documents, each contribution being obvious to a person skilled in the art "A" document not member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 18 FEBRUARY 2000		Date of mailing of the international search report 02 MAR 2000
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703) 305-3230		Authorized officer GABRIELE ELISABETH BOGALSKY Telephone No. (703) 308-0196

Form PCT/ISA/210 (second sheet)(July 1992)*

(68)

特表2002-531146

フロントページの続き

(51) Int. Cl.	識別記号	F I	テ-マ-ド (参考)	
C 1 2 N	5/10	C 1 2 N	15/00	Z N A A
C 1 2 P	21/02		5/00	A
(72) 発明者 フラドコフ, アルカディ フェドロビッ チ ロシア国 113570, モスクワ, 35/2 -14, ウーリツァ ドニエプロベトロ フスカヤ				
(72) 発明者 ラバス, マーリイ アレクサンドロビッ チ ロシア国 117465, モスクワ, 35- 416, ウーリツァ ゲネラ チュレ ネバ				
(72) 発明者 マツ, ミハイル ウラディミロビッチ ロシア国 117465, モスクワ, 712- 28, ウーリツァ テブリイ スタン				
Fターム(参考) 4B024 AA11 BA80 CA04 CA20 DA06 GA11 GA19 GA27 HA03 4B064 AG01 CA02 CA19 CC01 CC06 CC12 CC24 CE12 DA13 4B065 AA01X AA26X AA58X AA72X AA87X AA90Y AB01 AC14 BA01 BA24 BB01 BC03 BC09 BC26 BD14 CA24 CA46 CA52 4H045 AA10 AA20 BA10 BA41 CA50 EA50 FA74 GA26				

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☒ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.